

Abortive Initiation
mit der RNA Polymerase II
aus Kalbsthymus

Angelika Zufall

Diss
München
1985

Abortive Initiation mit der RNA Polymerase II
aus Kalbsthymus

Dissertation
der
Fakultaet fuer Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen

vorgelegt von

Angelika Zufall

Muenchen

1985

Dissertation, eingereicht am 29.3.1985

1. Gutachter : Prof. Dr. G. Hartmann
2. Gutachter : Prof. Dr. E. Winnacker

Tag der muendlichen Pruefung : 31.5.85

Die vorliegende Arbeit wurde vom September 1981 bis Mai 1985 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. G. R. Hartmann am Institut fuer Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen ausgefuehrt.

Herrn Dr. I. Kemenes, Muenchen danke ich fuer die Klone p0,8 und p β EH2,0, Herrn Dr. W. Werr, Koeln fuer die Klone pSS und pSSS und Herrn Professor Dr. H. Hilz, Hamburg fuer zwei Praeparationen von Poly(ADP-Ribose)Polymerase.

Bei allen Mitarbeitern moechte ich mich fuer die erwiesene Hilfsbereitschaft und Unterstuetzung, aber auch fuer kritische Diskussionen, bedanken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Zusammenfassung</u>	1
<u>Einleitung</u>	3
<u>Material und Methoden</u>	7
<u>Material</u>	7
Enzyme	7
Nukleinsaeuren	7
Chemikalien und Geraete	10
<u>Methoden</u>	11
Plasmid Isolierung	11
DNA Abbau mit Restriktionsenzymen	12
DNA Fragmentisolierungen	12
Aktivitaetstest fuer die Kalbsthymus	
RNA Polymerase II	14
Transkriptionsansaeetze	16
Gelelektrophorese	18
Papierchromatographie	20
Quantitative Auswertung von	
Papierchromatogrammen und Autoradiographien	20
Identifizierung der Dinukleotide	21

<u>Ergebnisse</u>	23
<u>Nachweis einer Dinukleotidsynthese durch</u>	
<u>Kalbsthymus RNA Polymerase II</u>	23
Produktanalyse	23
Charakterisierung der Reaktion	32
Wirkung von Inhibitoren	36
<u>Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die</u>	
<u>Dinukleotidsynthese</u>	39
Einfluss der spezifischen Aktivitaet der	
RNA Polymerase II	39
Regenerierendes System	43
Ionenstaerke	45
Zweiwertige Metallionen	47
DNA- und RNA Polymerase Konzentration	50
Inkubationszeit	53
<u>Analyse der Spezifitaet von Kalbsthymus</u>	
<u>RNA Polymerase II bei der Dinukleotidsynthese</u>	55
Initiation an verschiedenen	
Startstellen einer Matrize	56
Einfluss der Nukleotidkombination	56
Einfluss der Nukleotidkonzentration	72
Einfluss von Poly(ADP-Ribose)Polymerase	77
Einfluss von Magnesium und Superhelikalitaet	80
Initiation an verschiedenen DNA Bereichen	85
Initiation an verschiedenen DNA Spezies	88
Vergleich der Kalbsthymus- und Weizenkeim	
RNA Polymerase II	93

<u>Diskussion</u>	98
<u>Literaturverzeichnis</u>	108
<u>Abkuerzungsverzeichnis</u>	115
<u>Lebenslauf</u>	116

Zusammenfassung

Gereinigte Kalbsthymus RNA Polymerase II erzeugt in einer abortiven Initiationsreaktion Dinukleosidtetraphosphate, deren Synthese DNA- und Metallionen-abhaengig ist.

Die Analyse eines Dinukleosidtetraphosphates - mit Hilfe enzymatischer Abbaureaktionen - , welches aus der Reaktion von ATP und [α - 32 P] UTP an dem Plasmid pSmaF/SmaI in Anwesenheit von Mn^{2+} oder Mg^{2+} synthetisiert wird, ergibt als Hauptprodukt das Dinukleotid pppApU.

In Analogie zu dieser Reaktion bilden sich mit ATP und einem zweiten Nukleotid, bzw. ATP oder GTP allein, weitere Dinukleosidtetraphosphate wie pppApA, pppGpG, oder pppApC. Der Austausch von ATP gegen ADP oder AMP bewirkt bereits eine Reduktion der Dinukleotidsyntheserate, und ein Ersatz durch Adenosin, oder CTP, bzw. UTP fuehrt nur noch geringfuegig zu einer Produktbildung.

Die Dinukleotidsynthese mit Kalbsthymus RNA Polymerase II erweist sich als Heparin sensitiv, ist aber durch 1 $\mu g/mL$ α -Amanitin (10^{-6} M) nicht hemmbar. Dagegen wird die Synthese langkettiger RNA Transkripte mit dem gleichen Enzym durch eine 10^{-6} M α -Amanitin Konzentration unterdrueckt.

Die abortive Initiation an einer DNA Matrize mit Hilfe verschiedener Nukleotidkombinationen laesst eine Praeferenz der Kalbsthymus RNA Polymerase II fuer bestimmte Startstellen aus der quantitativen Verteilung der gebildeten Dinukleotide erkennen. Die an allen untersuchten Matrizen synthetisierten Dinukleosidtetraphosphate ppp(A,U) und pppApA werden in den meisten Faellen auch bevorzugt gebildet.

In Abhaengigkeit von der verwendeten DNA Matrize entstehen aus einer entsprechenden Nukleotidkombination aber auch pppGpG, ppp(A,G) und ppp(A,C) mit unterschiedlicher Frequenz.

Poly(ADP-Ribose)Polymerase, ein Enzym, welches die "nick" Initiation bei der spezifischen Transkription unterdrueckt, zeigt bei der Dinukleotidsynthese - unabhaengig von der verwendeten DNA und den verwendeten Restriktionsenzymen - eine Reduktion der ppp(A,U) Synthese, waehrend es auf die Bildung von pppGpG, ppp(A,G) und ppp(A,C) keinen Einfluss hat.

Auch der Zustand der DNA Matrize - superhelikal oder mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten - erweist sich als unabhaengig von der Praeferenz der Kalbsthymus RNA Polymerase II fuer bestimmte Matrizen bei der Synthese des Dinukleosidtetraphosphats pppApA.

An den verwendeten chimaeren Plasmiden initiiert die RNA Polymerase nicht ausschliesslich an den eukaryontischen Fragmenten; bezogen auf eine bestimmte DNA Laengeneinheit wird allerdings an der eukaryontischen DNA ungefaehr doppelt so viel Dinukleosidtetraphosphat synthetisiert wie an der prokaryontischen DNA.

Ein quantitativer Vergleich der Dinukleotidsynthese an verschiedenen Matrizen weist fuer die Synthese von ppp(A,U) - nicht fuer pppGpG oder ppp(A,G) - eine Praeferenz der Kalbsthymus RNA Polymerase II fuer die homologe Kalbsthymus DNA auf.

Einleitung

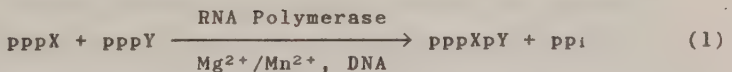
Die Synthese von mRNA in Eukaryonten ist - verglichen mit der in Prokaryonten - ein relativ komplexer Vorgang, der Prozesse wie Initiation, "Cap"-Synthese, Methylierung, Termination, Polyadenylierung und "Splicing" einschliesst.

Bei *in vitro* Versuchen im RNA Polymerase II System versucht man daher diese einzelnen Prozesse zu entkoppeln.

So verwendet man geschnittene DNA Matrizen, um durch die Synthese von "run-off" Transkripten das Problem der Termination abzutrennen.

Die Ausbildung der "cap"-Strukturen hat sich als unabhaengig von der Bildung kurzer RNA Transkripte erwiesen (Coppola et al., 1983; Samuels et al., 1984), so dass eine selektive Beobachtung von Initiation und Elongation moeglich ist.

Eine Entkoppelung dieser beiden Vorgaenge sollte mit Hilfe der abortiven Initiation zu erreichen sein, wie das bereits 1976 fuer Prokaryonten mit gereinigter *Escherichia coli* RNA Polymerase geschehen ist (Gleichung 1) (Johnston & McClure, 1976).



Die abortive Initiation ermöglicht es, den Vorgang der Initiation gesondert zu betrachten.

Gereinigte eukaryontische RNA Polymerase II galt allerdings bislang als unfahig zur *de novo* Initiation, der Hauptteil der synthetisierten RNA ist demnach kovalent mit 3'-OH Enden oder "nicks" einer DNA verknuepft (Lewis & Burgess, 1982; Dreyer & Hausen, 1976).

Daher werden spezifische Transkriptionen mit Ganz-Zell Extrakten (Manley et al., 1980) oder fraktionierten Zellkern Extrakten (Dignam et al., 1983a) durchgefuehrt.

Bei der abortiven Initiation laesst sich das Problem der kovalenten Verknuepfung von synthetisierten Dinukleotiden dadurch vermeiden, dass man Purin-Nukleosidmonophosphate als Primer einsetzt, die fuer eine Elongation von der RNA Polymerase nicht akzeptiert werden.

Unter diesen Bedingungen konnten Lescure et al. (1981) mit gereinigter Hefe RNA Polymerase II die Synthese des Dinukleotids pApU aus AMP und UTP nachweisen. Auch Kalbsthymus RNA Polymerase II synthetisiert unter diesen Bedingungen pApU, allerdings in einer α -Amanitin insensitive Reaktion, da dieses Toxin moeglicherweise erst den Translokationsmechanismus des Kalbsthymus Enzyms hemmt (Vaisius & Wieland, 1982).

Es blieb aber offen, ob eukaryontische RNA Polymerase II auch zu einer Dinukleosidtetraphosphatsynthese, im Sinne der fuer Prokaryonten beschriebenen abortiven Initiation (Gleichung 1), faehig ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Dinukleosidtetraphosphatsynthese mit Kalbsthymus RNA Polymerase II erstmals nachgewiesen werden. Auch mit Weizenkeim RNA Polymerase II ist eine abortive Initiation moeglich (Mosig et al., 1985).

Diese Beobachtung steht in Einklang mit in letzter Zeit erschienenen Arbeiten ueber spezifische Transkription mit gereinigter eukaryontischer RNA Polymerase II, also ohne Zellextrakte (Tsuda & Suzuki, 1982; Lescure, 1983), wobei Kalbsthymus RNA Polymerase II promotor-spezifisch im Bereich der Goldberg-Hogness Box des Adenovirus 2 Major Late Promotor initiiert (Mishoe et al., 1984).

Da die Synthese eines Dinukleotids aus zwei Nukleosidtriphosphaten eine "nick" induzierte *de novo* Synthese - wie diese fuer Weizenkeim RNA Polymerase II beschrieben ist (Lewis & Burgess, 1980) - nicht ausschliesst, ergab sich als weiterer Schritt die Bestimmung des Einflusses von Poly(ADP-Ribose)Polymerase. Dieses Enzym lagert sich an DNA "nicks" an und blockiert damit die Initiation an diesen Stellen (Slattery et al., 1983).

Auch vergleichende Dinukleotidsynthesen an geschnittener und ungeschnittener DNA sollten Aufschluss darueber geben, ob das gereinigte Enzym "nicks", die u.U. durch Restriktionsenzyme verursacht werden, als Primer benutzt (Lewis & Burgess, 1980) oder ob eine *de novo* Dinukleotidsynthese vorliegt.

Die abortive Initiation verlauft mit prokaryontischer RNA Polymerase promotor-spezifisch (Johnston & McClure, 1976). Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit behandelt daher die Spezifitaet der Kalbsthymus RNA Polymerase II bei der Dinukleotidsynthese.

Die Synthese langkettiger RNA mit gereinigter Kalbsthymus RNA Polymerase II hat gezeigt, dass eine Initiation im Bereich der Goldberg-Hogness Box des Ad 2 MLP erfolgt (Mishoe et al., 1984). Auch aus Arbeiten ueber spezifische Transkription mit Hilfe von Hela Zellextrakten ist eine Initiation an der TATA Box bekannt. So initiiert Hela RNA Polymerase II an der Goldberg-Hogness Box des Ad 2 MLP oder des Conalbumin Gens (Davison et al., 1983) und *Drosophila melanogaster* RNA Polymerase II an der TATA Box eines *Drosophila melanogaster* Histon- bzw. Aktin Gens (Parker & Topol, 1984).

Eine Analyse der Nukleotidkombinationen, die zu einer Dinukleosidtetraphosphatsynthese fuehren, sollte zeigen, ob es eine Praeferenz fuer bestimmte Startstellen gibt und ob eine Initiation im Bereich der Goldberg-Hogness Box einer DNA Matrize moeglich ist.

Die abortive Initiation an den isolierten Fragmenten eines chimaeren Plasmids sollte weiterhin Aufschluss darueber geben, ob die Dinukleotidsynthese spezifisch an eukaryontischer DNA - wie dem Bereich der TATA Box - stattfindet, oder ob die Kalbsthymus RNA Polymerase II auch am prokaryontischen Fragment initiiert.

Darueber hinaus stellt sich die Frage, ob die Kalbsthymus RNA Polymerase II auf der Ebene der Dinukleotidsynthese zu einer Differenzierung zwischen verschiedenen eukaryontischen Matrizen faehig ist.

Auch ein Vergleich der Dinukleosidtetraphosphatsynthese durch Kalbsthymus- mit der durch Weizenkeim RNA Polymerase II an einer DNA Matrize sollte eine derartige Differenzierung aufzeigen.

Material und Methoden

Material

Enzyme

Die Kalbsthymus RNA Polymerase II ist nach der Vorschrift von Hodo & Blatti (1977) angereichert, wobei die aktiven Fraktionen der Phosphocellulose Saeule fuer die Transkriptionen verwendet werden. Die Proteinkonzentration betraegt etwa 0,7 mg/mL, die spezifische Aktivitaet 17 u/mg. Das Enzym wird in fluessigem Stickstoff gelagert und bleibt ueber mindestens 6 Monate stabil, wobei die Aktivitaet um etwa 10 % abnimmt.

Alkalische Phosphatase aus Kaelberdarm, Nukleosid-5'diphosphat Kinase und Nukleosid-monophosphat Kinase, verschiedene Restriktionsenzyme, RNase A, Proteinase K, Ribonuklease T2 aus *Aspergillus oryzae* und Phosphodiesterase I aus *Crotalus adamanteus* werden von Boehringer Mannheim oder Biolabs bezogen.

Nukleinsauren

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Plasmide verwendet, die - falls nicht anders vermerkt - immer mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut sind (Tab.1.):

pSmaF	$7,43 \cdot 10^6$ D	11262 Bp
pO,8 ¹	$3,41 \cdot 10^6$ D	5173 Bp
p EH2,0 ¹	$4,42 \cdot 10^6$ D	6700 Bp
pSV	$5,87 \cdot 10^6$ D	8900 Bp
pBR322	$2,88 \cdot 10^6$ D	4363 Bp
pSSS	$5,72 \cdot 10^6$ D	8662 Bp
pSS83 ²	$13,33 \cdot 10^6$ D	20200 Bp

Tab.1. Uebersicht ueber die verwendeten Nukleinsauren.

Plasmid	Restriktions- enzym	eukaryontisches Fragment	Literatur
pSmaF	SmaI	SmaF Fragment des Ad2 mit dem Ad2 MLP. Das Fragment besteht aus 2462 Bp (11,5 - 18,5 %) und ist in die SmaI Stelle von pBR313 kloniert.	Gingeras et al., 1982
p0, 8 ¹	PstI	p0, 8 enthaelt in der PstI Schnittstelle von pBR322 etwa 770 Bp des Huehnerlysozym Gens mit dem <i>in vivo</i> Promotor und der mRNA Startstelle.	
pβEH2, 0 ¹	EcoRI, HindIII	pβEH2, 0 enthaelt, in pBR322 kloniert, ungefaehr 2378 Bp des β-Globin Gens des erwachsenen Huhnes mit dem <i>in vivo</i> Promotor und der mRNA Startstelle. Das eukaryontische Insert ersetzt dabei die 31 Bp des pBR322 zwischen den Schnittstellen von EcoRI und HindIII.	
pSV	BamHI	Das Plasmid enthaelt die 5243 Bp des SV40, der in die BamHI Stelle von pBR322 kloniert ist.	Dolan et al. 1983 Reddy et al. 1978

Fortsetzung von Tab.1.

Plasmid	Restriktions- enzym	eukaryontisches Fragment	Literatur
pBR322	BamHI		
pSSS ²	BamHI, SphI	pSSS enthaelt zwischen der BamHI und der SphI Schnittstelle von pBR322 etwa 4200 Bp des Sucrosesynthetase Gens aus Mais. Es handelt sich um einen Subklon von pSS; dieses Plasmid enthaelt in der BamHI Schnittstelle von pBR322 etwa 16300 Bp des Mais Gens.	Sutcliffe, 1978
pSS83	EcoRI	pSS83 enthaelt 14200 Bp des Ti Plasmids aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> in der EcoRI Stelle von pDB800 (pBR325 Derivat) mit dem Nopalinsynthasegen.	Schweitzer et al.1980

- 1 Ein entsprechender Klon wurde mir freundlicherweise von Dr.igo Kemenes, Muenchen zur verfuegung gestellt.
- 2 Der Klon wurde mir freundlicherweise von Dr. Wolfgang Werr, Koeln ueberlassen.
Die Plasmide pSSS und pSS83 wurden von Frau H.sieber angereichert, das Plasmid pSV stellte mir Herr M.schaich zur verfuegung. Kalbsthymus DNA (Doehringerr Mannheim) ist mit EcoRI verdaut.

Chemikalien und Geraete

Die radioaktiv markierten Nukleotide [α - 32 P]ATP, [α - 32 P]CTP, [α - 32 P]GTP und [α - 32 P]UTP werden von Amersham, Buchler bezogen, alle weiteren Nukleosidverbindungen von Boehringer Mannheim.

Die Materialien fuer Chromatographie, Gelektrophorese und Autoradiographie entsprechen denen von Mosig (1982), ebenso die uebrigen Chemikalien.

Fuer die Saeulenchromatographie werden die Ionenaustauscher DE 52 (Whatman, Hormuth und Vetter, Wiesloch, Baden) und P 11, von der gleichen Firma, bezogen. Die Papierchromatographie ist auf Whatman 3MM Papier (Whatman, Hormuth und Vetter, Wiesloch, Baden), die Duennschichtchromatographie auf Polyethylenimin Cellulose Folien (Merck AG, Darmstadt, Art. 5579) ausgefuehrt. Fuer das Pipettieren kleiner Volumina - zwischen 1 und 3 μ L - wird eine Gilson Pipette mit Teflonkolben verwendet (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, Frankreich).

Neben den von Mosig (1982) aufgefuehrten Geraeten sind ein Speed Vac Concentrator (Bachofer, Reutlingen), ein Mikrodensitometer 3CS (Joyce LoebL, Gateshaed, England) und ein Duennschicht Scanner (Berthold, Muenchen) eingesetzt worden.

Methoden

Plasmid Isolierung

Die verwendeten Plasmide werden - mit Ausnahme von pSS83, welches sich in dem *Escherichia coli* Stamm CS 600 befindet - in dem *Escherichia coli* Stamm HB 101 angereichert und nach Chloramphenicol Stimulierung nach Brack (1983) bzw.

Schweitzer et al. (1983) oder Maniatis (1982) isoliert. Nach einer Caesiumchlorid Gradientenzentrifugation inkubiert man das Plasmid 30 min bei 37°C mit RNase A (20 µg/µL), dann verdaut man ueber Nacht bei 37°C (Brutschrank, Paraffin) mit Proteinase K (50 µg/µL). Phenolisieren und Faellen erfolgt wie bei Maniatis (1982) beschrieben. Dann wird eine zweite Caesiumchlorid Gradientenzentrifugation angeschlossen. Die einzelnen Plasmide werden nach folgenden Methoden angereichert (Tab.2.) :

Tab.2. Anreicherungsverfahren fuer die verwendeten Plasmide

Plasmid	Antibiotikum	angereichert nach
pSmaF	Tetracyclin	Maniatis, 1982
p0,8	Tetracyclin	Maniatis, 1982
pβEH2,0	Ampicillin	Maniatis, 1982
pSV	Ampicillin	Maniatis, 1982
pBR322	Ampicillin, Tetracyclin	Brack, 1983
pSSS	Ampicillin	Brack, 1983
pSS83	Ampicillin	Schweitzer et al., 1983

Die Konzentration der erhaltenen DNA Loesung wird durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt. 20 O.D. entsprechen einer DNA Konzentration von 1 mg/mL.

DNA Abbau mit Restriktionsenzymen

Je 20 μg DNA werden in 50 μL eines dem Restriktionsenzym entsprechenden Maniatis Puffers (Maniatis, 1982) mit 20 u des Enzymes bei 37°C fuer 90 min inkubiert.

Bei Mehrfachschnitten wird mit dem Enzym/Puffer System mit dem niedrigsten Salz zuerst geschnitten, die zweite Abbaureaktion mit hoeherer Salzkonzentration wird dann angeschlossen.

Fuer Fragmentisolierungen betraegt das Inkubationsvolumen 250 μL zum Abbau von 100 μg DNA.

Die Kontrolle der DNA Schnitte erfolgt auf 0,8 % Agarose Flachbettgelen.

DNA Fragmentisolierungen

Um das eukaryontische und das prokaryontische Fragment eines chimaeren Plasmids zu isolieren, werden 100 μg des geschnittenen Plasmids in einen 2 - 6 cm langen Slot eines 1 cm dicken 0,8 % Agarose/Ethidiumbromid Geles aufgetragen. Die Slotlaenge richtet sich nach dem Groessenunterschied der zwei Fragmente; bei groesserer Differenz reicht ein kleinerer Slot, da die Auftrennung der Fragmente deutlich genug ist. Die Ausbeuteverluste sind bei einer kuerzeren, breiteren Bande geringer. Das Auftragsvolumen wird so gering wie moeglich gehalten, es betraegt meistens 250 μL . Die Elektrophoresedauer betraegt bei 5 V/cm ungefaehr 16 Stunden. Die Isolierung der Banden erfolgt dann in einer Abwandlung der Methode von Yang et al. (1979) (Fig.1.).

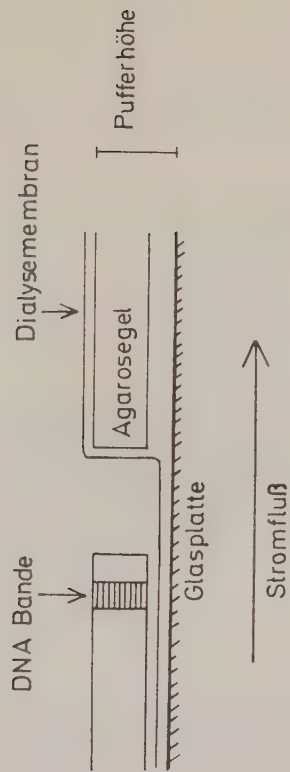


Fig.1. Anordnung zur Isolierung von DNA Fragmenten

In einem Slot, der unter der jeweils zu isolierenden Bande mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und mit einer Dialysemembran ausgekleidet ist, sammelt sich die DNA an der Dialysemembran. Unter langwelligem UV Licht laesst sich dann das Fragment mit einer Eppendorf Pipette absaugen. Durch mehrmalige Extraktion der DNA Loesung mit Butanol erfolgt gleichzeitig mit einer Entfernung des Ethidiumbromids eine Volumeneinengung. Nach etwa 5 maliger Extraktion wird das Fragment durch Ethanol gefaellt und in TE Puffer (10mM TrisHCl pH7,4, 0,1mM EDTA pH8,0) geloest (Maniatis, 1982). Die Ausbeute liegt bei diesem Verfahren zwischen 30 und 60 %.

Wendet man die Methode von Maxam und Gilbert (1977) auf Agarose Gele an, so ergibt sich in etwa die gleiche Ausbeute, aber die DNA enthaelt u.U. noch Spuren von Agarose. Der Elutionspuffer hat in diesem Fall die folgende, abgewandelte Zusammenetzung: 10mM TrisHCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS

Die DNA Konzentration wird ueber die Messung der optischen Dichte bei 260 nm oder ueber Verduennungsreihen auf Agarosegelen mit Hilfe von bekannten Mengen einer Vergleichs-DNA bestimmt (Schaeffner, 1984).

Aktivitaetstest fuer die Kalbsthymus RNA Polymerase II

Die Aktivitaeten der einzelnen Fraktionen der Kalbsthymus RNA Polymerase II Anreicherung werden, wie bei Hodo und Blatti (1977) beschrieben, bestimmt.

In einem Endvolumen von 60 μL sind enthalten:

3 μmol	TrisHCl pH 7,9
100 nmol	MnCl ₂
20 μg	denaturierte Kalbsthymus DNA
36 nmol	GTP, CTP, ATP
600 pmol	UTP mit 0,2 μCi [α - ³² P]UTP
15 μL	Puffer
10 μL	Enzymloesung

Der Puffer hat die folgende Zusammensetzung:

33 %	Glycerin
50 mM	TrisHCl pH 7,9
5 mM	MgCl ₂
0,1 mM	EDTA
0,5 mM	DTT
50 mM	Ammoniumsulfat

Die RNA Synthese wird durch die Zugabe des Enzyms gestartet, und fuer 10 min bei 37°C durchgefuehrt. 1 u Enzymaktivitaet ist definiert als die Menge UMP, die in 10 min bei 37°C in RNA eingebaut wird: 1 nmol UMP/10 min = 1 u

Transkriptionsansätze

Der Standardansatz der abortiven Transkription enthaelt in einem Endvolumen von 25 μL :

- 0,25 μg pSmaF/SmaI
- 5 μg Kalbsthymus RNA Polymerase II
- 7,5 μg Creatinphosphokinase
- 15 mM Creatinphosphat
- 10 mM Hepes pH 7,9
- 60 mM NaCl
- 0,25 mM DTT
- 10 % Glycerin
- 1 mM MnCl_2
- 500 μM ATP
- 25 μM UTP mit 1 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$

Da die DNA Saettigungskonzentration bei jeder DNA Matrize verschieden ist, wird bei vergleichenden Transkriptionen je 0,1 pmol DNA/25 μL eingesetzt. Bei dieser Konzentration erweist sich jeder Ansatz als DNA gesaettigt, d.h. eine hoehere DNA Menge laesst keine hoehere Dinukleotidbildung erkennen. Transkriptionsansätze, die die Wirkung von RNA Polymerase Inhibitoren aufzeigen sollen, werden mit 1 $\mu\text{g/mL}$ α -Amanitin, 2 $\mu\text{g/mL}$ Heparin, 100 $\mu\text{g/mL}$ Heparin oder 2 $\mu\text{g/mL}$ Rifampicin durchgefuehrt, wobei diese Substanzen jeweils 5 min mit dem Enzym bei Raumtemperatur vorinkubiert werden. Die Metallionen Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} werden wie Mn^{2+} in 1 mM Konzentration eingesetzt, Mg^{2+} aber auch 7,5 und 10 mM. Nukleosidphosphatkinasen werden in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$ zugegeben.

Neben ATP und UTP enthalten die Ansätze zur abortiven Initiation auch die Kombinationen ATP/CTP, ATP/GTP und Ado/AMP/ADP/UTP, wobei im allgemeinen die Startnukleosidverbindungen 500 μM und das zweite Nukleotid 25 μM vorliegen.

Das Pipettier- und Durchfuehrungsschema fuer den
Standardansatz sieht folgendermassen aus:

1,0 μ L pSmaF/SmaI

6,6 μ L Kalbsthymus RNA Polymerase II
im Anreicherungspuffer nach
Hodo & Blatti, 1977

5 min Inkubation bei 37°C

17,4 μ L Mix

3 Stunden Inkubation bei 37°C

Abstoppen der Reaktion durch drei-
minuetiges Erhitzen auf 56°C und
Abschrecken im Eisbad

20 μ L Auftragspuffer (7M Harnstoff,
0,1% Bromphenolblau,
0,1% Xylencyanol)

Gelelektrophorese

Der Mix besteht aus den uebrigen Bestandteilen des
Inkubationsansatzes, der meist fuer neun Proben
zusammenpipettiert wird, da die RNA Polymerase in 60 μ L
Portionen ($9 \times 6,6 = 60$) eingefroren ist. Dadurch werden die
Pipettierfehler verringert.

Mix :

5	μL Pufferkonzentrat, s.u.
3	μL Creatinphosphat, 5mM
1,5	μL Creatinphosphokinase, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
1	μL MnCl_2 , 25mM
1	μL ATP/UTP, 12,5/0,6mMol
5,9	μL [α - ^{32}P]UTP, 1 μCi

Pufferkonzentrat :

100	mM Hepes pH 7,9
600	mM NaCl
2,5	mM DTT
50	% Glycerin

Die radioaktive Loesung wird u.U. konzentrierter eingesetzt, falls Freivolumina fuer Inhibitoren oder Faktoren noetig sind.

Gelelektrophorese

POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE UND AUTORADIOGRAPHIE

Fuer eine Analyse der Dinukleotide wird ein 25 %

Polyacrylamid 8,3 M Harnstoff Gel verwendet, welches

Oligonukleotide bis zu cirka 30 Basen auftrennt (vgl. Mosig, 1982).

300 mL Gelloesung enthalten:

75	g Acrylamid
2,6	g N,N'-Methylenbisacrylamid
126	g Harnstoff
30	mL TBE Puffer pH 8, 10-fach konzentriert
	(50mM Tris, 50mM Borsaeure, 1mM Na_2EDTA)

20 mL der entgasten Gelloesung werden durch 25 μL Ammoniumperoxidisulfat (500mg/mL) und 15 μL N,N,N',N'-Tetramethyldiamin als Stuetzgel innerhalb von 5 min polymerisiert.

250 mL der entgasten Gelloesung werden mit 90 μL Ammoniumperoxidisulfatloesung und 40 μL N,N,N',N'-Tetramethyldiamin versetzt und ueber Nacht, oder aber mindestens 5 Stunden lang, polymerisiert. Die Gelgroesse betraegt 430 x 350 x 1,6 mm.

Die Gele werden vor Gebrauch etwa 1 bis 2 Stunden lang einer Vorelektrophorese unterworfen (TBE Puffer, 1000 V), dann mit der Probe ueber Nacht mit etwa 700 V elektrophoretisiert, bis der Marker Bromphenolblau 19 cm Abstand von der Startstelle erreicht hat.

Zur Autoradiographie wird eine Glasplatte vom Gel abgehoben, das Gel mit einer Haushaltsfolie abgedeckt und darueber ein Film (Fuji RX 50) gelegt. Die Exposition ist bei -70°C und teilweise mit Verstaerkerfolie (Cronex Quanta II Intensifying Screen, Du Pont, Wilmington, USA) durchgefuehrt.

AGAROSE GELELEKTROPHORESE

DNA Restriktionsfragmente werden auf 0,8 - 1,2 % Agarosegelen aufgetrennt und teilweise isoliert (siehe Fragmentisolierung). Die Flachbettgele werden in TBE Elektrodenpuffer mit Ethidiumbromid elektrophoretisiert, als Marker dient Bromphenolblau (Maniatis, 1982).

Fuer die Gelloesung loest man eine entsprechende Menge Agarose unter Erwaermen in 50 mL TBE Puffer (5 min Mikrowellenherd, Volumen ergaenzen) und nach Abkuehlen auf cirka 50°C gibt man 5 μL Ethidiumbromidloesung (10mg/mL) zu.

Papierchromatographie

Vor allem fuer quantitativ auszuwertende Versuche werden aufsteigende Chromatographien durchgefuehrt, wobei zwei Systeme zur Anwendung gelangen :

- Whatman 3MM Papier in Fliessmittel III (Hurlbert, 1957) mit 600 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 1 L 0,1M Natriumphosphat pH 6,8 + 20 mL n-Pentanol
- PEI Cellulose in 0,16 M LiCl (Randerath & Randerath, 1976)

Die Testansaetze werden jeweils auf 20 cm lange und 4 cm breite Streifen auf einer Startlinie in 2 cm Hoehe aufgetragen und etwa 4 bis 6 Stunden chromatographiert bis zu einer Fliessmittelfronthoehe von 17 bis 18 cm (bezogen auf die Startlinie).

Quantitative Auswertung von Papierchromatogrammen und Autoradiographien

Jeder Papierstreifen wird nach der Chromatographie in 18, je 1 cm breite, Streifen geschnitten und deren Radioaktivitaet in einen Szintillationsspektrophotometer bestimmt (Mosig, 1982). Die aus diesen Messungen resultierende Kurve zeigt einen pppApU Gipfel in 6 bis 8 cm Entfernung von der Startlinie. Verbindet man die Basislinie rechts und links des Peaks, so ergibt die darunter liegende Flaechen den Blindwert fuer die Dinukleotidsynthese.

Eine andere Auswertungsmoeglichkeit stellt das Scannen der Chromatogramme dar (vgl. Fig. 3.). Dabei ist die Peakflaeche entweder durch Ausschneiden und Wiegen oder ueber die Berechnung angenaehelter Dreiecke bestimmt.

Identifizierung der Dinukleotide

PRODUKTANALYSE VON pppApU

Die Identifizierung erfolgt aehnlich wie bei Mosig et al. (in Vorbereitung) beschrieben. Das Dinukleotid wird demnach in einem Standardansatz synthetisiert, allerdings mit einer zehnfachen spezifischen Radioaktivitaet, anschliessend wird mit 10 u alkalischer Phosphatase aus Kaelberdarm weitere zwei Stunden inkubiert. Nach einer Polyacrylamid Gelelektrophorese wird die ApU Bande aus dem Gel geschnitten, das Gelstueck durch eine 2 mL Spritze ohne Nadel in einen Zentifugieraufsatz (Mikrofilter No. 463900, Schleicher & Schuell) gedruickt (um einen eluierbaren Brei zu erzeugen) und mit 1 mL Wasser zweimal je eine Stunde lang bei Raumtemperatur extrahiert, dann ueber Nacht bei 4°C. Das Eluat wird durch Zentrifugation gewonnen. Um einen enzymatischen Abbau des Produktes zu ermoeeglichen, muss das Eluat entsalzt werden, d.h. insbesondere vom Harnstoff befreit werden. Dies geschieht durch eine Ionenaustauscherchromatographie an einer DEAE Cellulose Saeule (DE 52, Saeulendurchmesser 0,5 cm, Hoehe 1 cm). Der Elutionspuffer enthaelt Triethylammoniumcarbonat pH 8,0, das beim Einengen des Produktes zur Trockene (ueber Nacht) im Speed Vac Concentrator unter Zersetzung rueckstandslos verdampft.

Das radioaktive Produkt wird dann in 50 μ L Wasser aufgenommen. 10 μ L dieser Loesung werden in einer Endkonzentration von 0,2 M Tris-HCl pH 8,9 mit 1 μ g Phosphodiesterase aus *Cratalus adamanteus* in zwei Stunden bei 37°C gespalten. Fuer die Hydrolyse mit Ribonuklease T₂ aus *Aspergillus oryzae* wird ein 10 μ L Aliquot 5 Stunden lang bei 37°C mit 1 u T₂ in einem Puffer mit 12,5 mM Natriumacetat pH 4,5 (Endkonzentration) inkubiert. Die Analyse der Produkte erfolgt auf Whatman 3MM Papier, welches im Fliessmittelsystem III entwickelt wird. Die Produktgipfel werden durch Scannen identifiziert.

PRODUKTANALYSE VON pppApA, pppGpG UND ppp(A,C)

Wie bei der Identifizierung von pppApU wird an die Dinukleosidtetraphosphatsynthese im Standardsystem an pSmaF oder p β EH2,0 eine zweistufige Inkubation mit 10 u alkalischer Phosphatase aus Kaelberdarm angeschlossen. Nach der wie oben beschriebenen Isolierung der Dinukleosidmonophosphate werden diese direkt - ohne enzymatische Spaltung - auf PEI Cellulose in 0,16 M LiCl (Randerath & Randerath, 1967) durch Scannen identifiziert (vgl. Mosig et al., 1985). Als Vergleich dienen die kauflichen Dinukleotide ApA, ApG, GpA, GpG, CpC, CpA und ApC (Sigma, Taufkirchen), die unter UV Bestrahlung durch den UV-Fluoreszenz-Loescheffekt lokalisiert werden koennen.

Ergebnisse

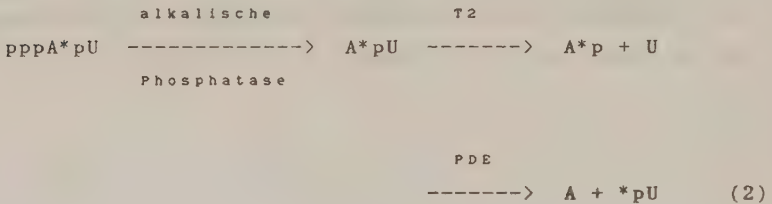
Nachweis einer Dinukleotidsynthese durch Kalbsthymus RNA Polymerase II

Inkubiert man Kalbsthymus RNA Polymerase II und das Plasmid pSmaF - geschnitten mit dem Restriktionsenzym SmaI - unter den angegebenen Standardbedingungen mit ATP und [α - 32 P]UTP (vgl. Methoden), so bildet sich zeitabhaengig ein Produkt, welches papierchromatographisch in einem Fliessmittelsystem, das Oligonukleotide auftrennt, verfolgt werden kann.

Produktanalyse

Zur Identifizierung des Produkts wird ein Teil des Transkriptionsansatzes nach der Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kaelberdarm behandelt. Alkalische Phosphatase spaltet Orthophosphat-Monoester - keine Phosphodiesterverbindungen, aber auch Monoester, die anhydridisch am Phosphat weitere Phosphatgruppen enthalten (Fernley & Walker, 1967). ATP wird also zu Adenosin abgebaut. Dieser Ansatz wird parallel mit einem Standardansatz auf einem 25% denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Eine Autoradiographie zeigt im Standardansatz drei Banden (Fig.2.a), von denen nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase nur noch eine, wesentlich hoeher liegende, Bande zu erkennen ist (Fig.2.b). Dieses deutlich langsamer

wandernde Produkt wird aus dem Gel eluiert und charakterisiert. Eine papierchromatographische Analyse ergibt einen R_f Wert von 0,09 (Fig.3.). Spaltet man das Produkt mit Ribonuklease T2 aus *Aspergillus oryzae*, welche 3'Mononukleotide erzeugt, so entsteht eine Verbindung mit dem R_f Wert 0,14. Unter meinen Bedingungen entspricht dieser R_f Wert dem von 3'AMP. Eine Spaltung mit Phosphodiesterase aus *Crotalus adamanteus*, welche 5'Mononukleotide erzeugt, ergibt eine Verbindung mit dem R_f Wert 0,75, der unter meinen Bedingungen dem von 5'UMP entspricht.



T2 = Ribonuklease T2 aus *Aspergillus oryzae*
PDE = Phosphodiesterase aus *Crotalus adamanteus*

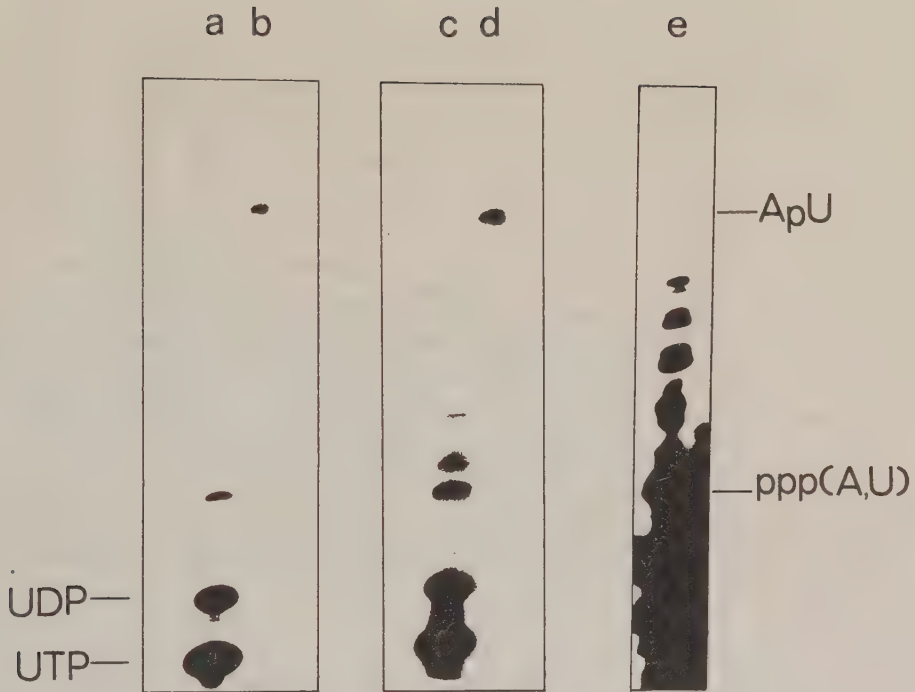


Fig.2. Gelelektrophoretische Auftrennung eines Transkriptionsansatzes unter Standardbedingungen mit pSmaF/SmaI und ATP, [α - 32 P]UTP,
 a vor und
 b nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase
 c,d nach laengerer Exposition
 e abortive Initiation mit ATP/UTP an T7 DNA mit Escherichia coli RNA Polymerase

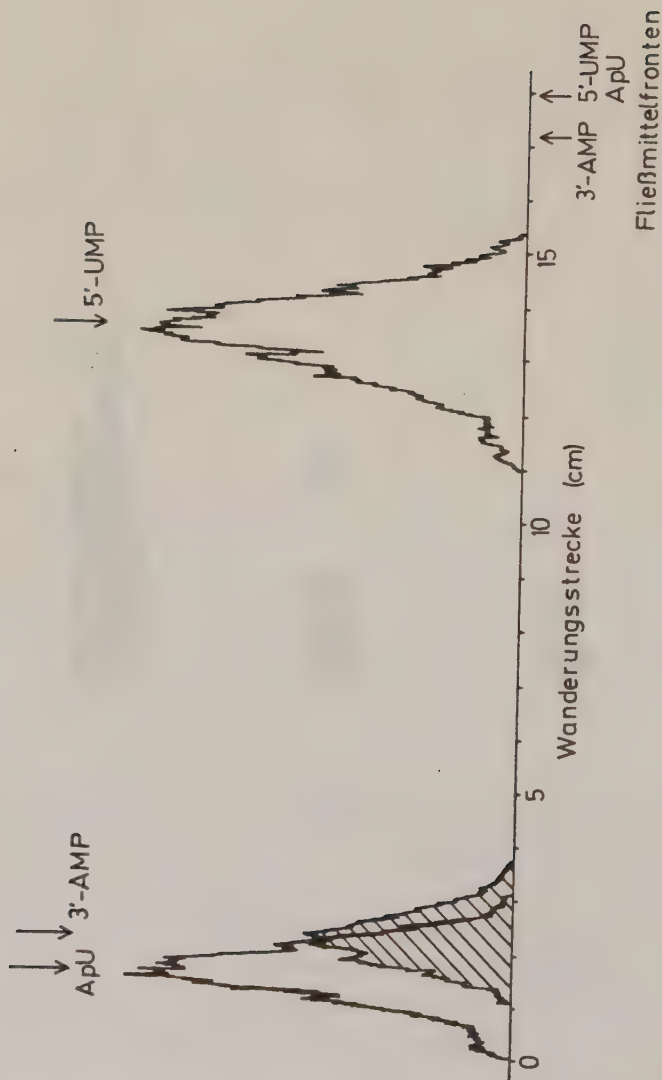
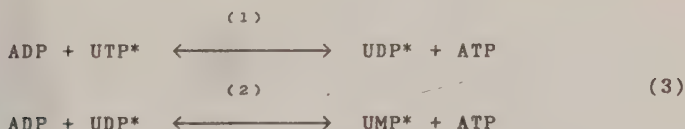


Fig. 3. Papierchromatographische Auflrennung der Hydrolyseprodukte des Dinukleotids pppA*pu mit Ribonuklease T2 und Phosphodiesterase aus Schlangengift. Die Spaltprodukte, die verschiedenen Ansaetzen entnommen sind, haben keinen quantitativen Bezug. Die Laufstrecken betragen 18 cm fuer die versuche mit ApU und 5'UMP und 17,3 cm fuer den Versuch mit 3'AMP (vgl. Pfeile).

Aus dem Spaltungsmuster laesst sich ablesen, dass in der beschriebenen Transkription das Dinukleosidtetraphosphat pppApU entsteht (Gleichungssystem 2). Bei der Autoradiographie entspricht die Bande in Fig.2.d folglich ApU. Um das Dinukleotid pppApU einer der drei Banden in Fig.2.a bzw. 2.c zuzuordnen, wird eine vergleichende Gelelektrophorese mit dem entsprechenden Dinukleosidtetraphosphat, welches von *Escherichia coli* RNA Polymerase in einer abortiven Initiation erzeugt wird, durchgefuehrt (Johnston & McClure, 1976) (Fig.2.e). Danach entspricht die oberste Bande dem Dinukleosidtetraphosphat.

Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei einer der beiden unteren Banden um unumgesetztes $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ handelt, und aus papierchromatographischen Analysen ergibt sich auch ein Hinweis auf entstehendes $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UDP}$. Um diese Vermutung zu beweisen, werden die notwendigen Referenzsubstanzen $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UDP}$ und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UMP}$ aus $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ mit Hilfe von Nukleosid-Phosphatkinasen und ADP in einer Gleichgewichtsreaktion erzeugt (Gleichungssystem 3) :



(1) Nukleosid-5'diphosphat Kinase

(2) Nukleosid-monophosphat Kinase

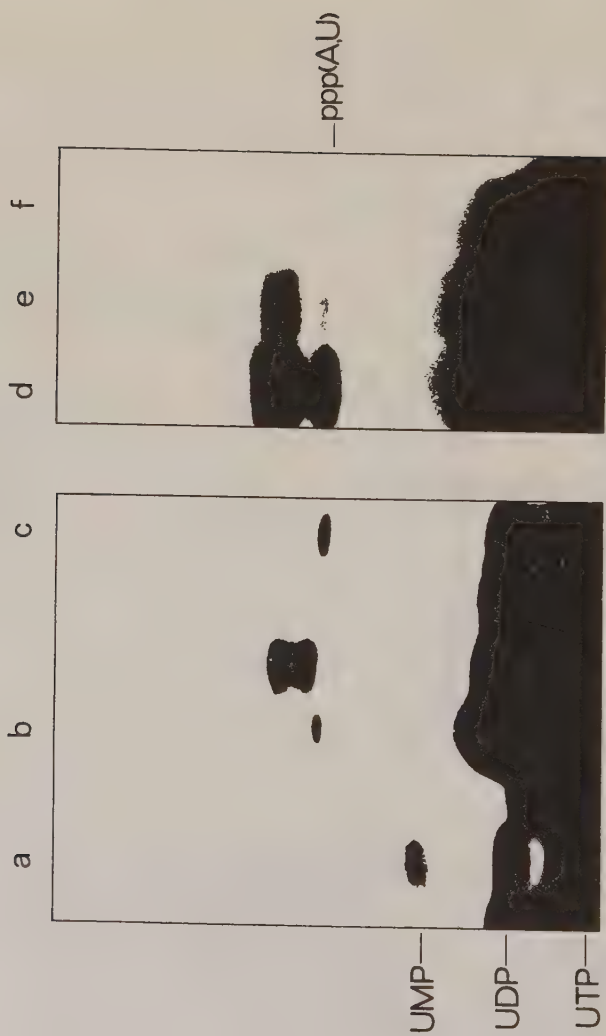


Fig.4. Synthese von UDP und UMP aus UTP mit Hilfe von Nukleosid-Phosphatkinasen, Einfluss des pH und die Wirkung des Creatinsystems.

- a Synthese von UDP und UMP aus UTP mit Hilfe von je 1 μg Nukleosid-5'diphosphatkinase und Nukleosid-monophosphatkinase. Der Ansatz enthaelt in 25 μL Endvolumen 500 μM UTP, 1 μCi [α - ^{32}P]UTP, 25 μM ADP und 5 μL Pufferkonzentrat (s. Material und Methoden)
- b abortive Initiation unter Standardbedingungen, aber mit 10 mM MOPS pH 7,0 anstatt 10 mM Hepes pH 7,9
- c Standardansatz bei pH 7,9
- d abortive Initiation unter Standardbedingungen mit 5 mM Creatinphosphat und 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Creatinphosphokinase
- e abortive Initiation unter Standardbedingungen ohne Creatinsystem
- f 1 μCi [α - ^{32}P]UTP in 25 μL Puffer (aus Pufferkonzentrat s. Material und Methoden)

Bei der Gelelektrophorese trennen sich diese drei Nukleotide gemaess ihrer Ladung so auf, dass UTP am schnellsten, und UMP am langsamsten wandert (Fig.4.a). Der Vergleich mit einem Standardansatz zeigt, dass in diesem Fall kein UMP gebildet wird, waehrend auf der Hoehe von UDP und UTP Banden zu erkennen sind (Fig.4.c). Der Versuch bestaetigt also, dass es sich in Fig.2.a bei den beiden Banden, die schneller als das Dinukleotid laufen, um UTP und UDP handelt, waehrend UMP nicht in erkennbarem Masse gebildet wird.

Nach der Inkubation mit alkalischer Phosphatase ist nur noch die A*pU Bande zu erkennen, da das gebildete radioaktive Phosphat bei der Elektrophorese aus dem Gel wandert (Fig.2.b). Vergleicht man die Intensitaeten der A*pU und der pppA*pU Bande, so faellt auf, dass die A*pU Bande etwas schwaecher ist. Eine densitometrische Analyse dieser beiden Banden ergibt fuer die A*pU Bande nur ungefaehr 85% der Schwaerzung der pppA*pU Bande. Moeglicherweise bedeutet dies, dass im Standardansatz neben 85% pppA*pU noch 15% pp*pUpA gebildet werden. Dieses Dinukleotid verliert bei der beschriebenen Phosphatasebehandlung die radioaktive Markierung und wird daher nicht erfasst. Die gleiche Aussage ergibt sich aus der Beobachtung, dass das mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ markierte pp*pApU nach der Behandlung mit alkalischer Phosphatase nur noch wenig Produkt erkennen laesst, bei dem es sich um U*pA handeln muss (ohne Beleg).

Die Dinukleotidbande des Standardansatzes besteht also wahrscheinlich aus den Dinukleotiden pppApU und etwas pppUpA, die sich in ihren gelelektrophoretischen Eigenschaften nicht unterscheiden (Schaeffner, 1984). Im folgenden wird diese Bande daher als ppp(A,U) bezeichnet. Bei laengerer Expositionszeit einer Autoradiographie des Standardansatzes erkennt man ueber der Dinukleotidbande zusaetzlich zwei weitere Banden (Fig.2.c). Direkt ueber der Dinukleotidbande erscheint eine breite, diffuse Bande, die u.U. aus einer Ueberlagerung mehrerer Banden entsteht. Die

zweite zusaetzliche Bande ist schwaecher und laeuft deutlich langsamer als die Dinukleotidbande.

Erzeugt man das Dinukleotid pppApU durch Inkubation von *Escherichia coli* RNA Polymerase an T7 DNA, so ergibt die gelelektrophoretische Produktanalyse die gleichen Banden in einer Leiter von Verlaengerungsprodukten (Fig.2.e). Nach Johnston und McClure (1976) enthalten die kaeuflichen Nukleosidtriphosphatpraeparationen Verunreinigungen der uebrigen Nukleotide (vgl. auch Lewis & Burgess, 1982), so dass diese laengerkettigen Produkte gebildet werden. Bei der langsamsten, schwachen Bande im Standardansatz duerfte es sich daher um ein Trinukleosidpentaphosphat handeln. Die breite Bande bzw. Mehrfachbande direkt ueber dem Dinukleotid koennte analog durch die geringfuegige Synthese anderer Dinukleosidtetraphosphate verursacht sein, denn Dinukleotide mit verschiedenen Basen werden bei der Gelelektrophorese aufgetrennt und wandern in diesem Bereich (vgl. Fig.15.).

Charakterisierung der Reaktion

Bei der abortiven Initiation des SmaI geschnittenen Plasmids pSmaF mit der Nukleotidkombination ATP/UTP durch die Kalbsthymus RNA Polymerase II entsteht neben dem Dinukleosiddiphosphat ppp(A,U) auch UDP. Um zu pruefen, ob diese Reaktionsprodukte auf die verwendete RNA Polymerase II Praeparation zurueckzufuehren sind, werden verschiedene Kontrollen durchgefuehrt (Fig.5.).

Inkubiert man bei einer abortiven Initiationsreaktion ohne DNA, so ist auf einer Autoradiographie fast keine Dinukleosiddiphosphatbande zu beobachten (Fig.5.A.m), und auch ohne RNA Polymerase wird kein Dinukleotid synthetisiert (Fig.5.A.n).

Die Abhaengigkeit der Nukleosiddiphosphatbildung von der RNA Polymerase Praeparation ist in Figur 5.C.n. aufgezeigt, wobei hier die Dinukleotidsynthese mit ATP/[α - 32 P]GTP analysiert ist (Fig.5.C.m,n,g). Man erkennt hier, dass ein Nukleosiddiphosphat nur in Anwesenheit der RNA Polymerase II gebildet wird (Fig.5.C.g), und zwar unabhaengig von einer DNA Zugabe (Fig.5.C.m). Die Bande zwischen GDP und GTP ist auf eine Verunreinigung des GTP zurueckzufuehren, da als Kontrolle allein aufgetragenes GTP die gleiche Bande aufweist (Fig.5.C.p).

Die Nukleosiddiphosphatbildung erweist sich somit als nicht DNA abhaengig und ist wahrscheinlich auf die Verunreinigung der RNA Polymerase II Praeparation mit einer basenunspezifischen Nukleosidtriphosphat-Phosphohydrolase zurueckzufuehren (Vaisius & Wieland, 1982).

Inkubiert man einen Standardansatz nur mit UTP, also ohne ATP, so entsteht neben UDP ein Produkt, das etwas schneller als ppp(A,U) wandert (Fig.5.B.o). Es handelt sich dabei wahrscheinlich um pppUpU (ohne Beweis), welches in sehr geringer Menge synthetisiert wird. Dieses Dinukleotid ist fuer eine abortive Initiationsreaktion mit Weizenkeim RNA Polymerase II charakterisiert und laeuft etwas schneller als ppp(A,U) (Schaeffner, 1984).

Die Versuche, bei denen ATP durch geringer phosphorylierte Adenosinderivate ersetzt ist, sind - anders als im Standardansatz - ohne Creatinsystem durchgefuehrt um eine Phosphorylierung zu verhindern. Es zeigt sich, dass bei der Verwendung dieser Derivate in allen drei Faellen die geringfuegige Synthese eines Produktes auftritt, welches etwas schneller wandert als ppp(A,U) und mit der Nukleotidkombination ATP/UTP nicht zu erkennen ist (Fig.5.A.a,c,e). Der Vergleich mit einem Versuch ohne ATP laesst vermuten, dass es sich dabei um pppUpU handelt (Fig.5.B.o).

Die Kombination Ado/UTP fuehrt nicht in erkennbarem Masse zur Synthese von ApU (Fig.5.A.a). Mit der Kombination AMP/UTP bildet sich ein Produkt, welches deutlich langsamer als die Dinukleosidtetraphosphate wandert (Fig.5.A.c) und aus ADP/UTP entsteht eine Verbindung, die in der Gelelektrophorese kaum langsamer als ppp(A,U) laeuft (Fig.5.A.e). Es duerfte sich dabei um die zu erwartenden Dinukleotide pApU und ppApU handeln (Johnston & McClure, 1976; McClure & Cech, 1978). Die Primeraktivitaet von Adenosin erweist sich als sehr gering (eine ApU Bande ist nur auf dem Originalfilm schwach zu erkennen) und auch die Primeraktivitaet von AMP und ADP erscheint unter diesen Bedingungen schwach gegenueber der von ATP.

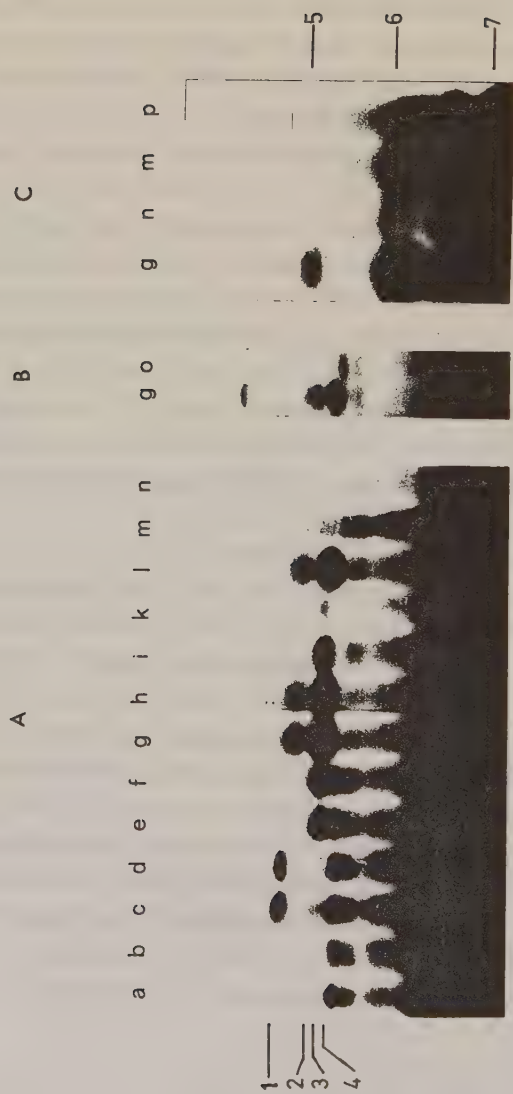


Fig.5. Versuche zur Charakterisierung der Dinukleotidsynthese

A.,B. Abortive Initiation unter Standardbedingungen

- a Ado/[α - 32 P]UTP
- b Ado/[α - 32 P]UTP, 1 μ g/mL α -Amanitin
- c AMP/[α - 32 P]UTP
- d AMP/[α - 32 P]UTP, 1 μ g/mL α -Amanitin
- e ADP/[α - 32 P]UTP
- f ADP/[α - 32 P]UTP, 1 μ g/mL α -Amanitin
- g Standardansatz
- h Standardansatz, 1 μ g/mL α -Amanitin
- i Standardansatz, 2 μ g/mL Heparin
- k Standardansatz, 100 μ g/mL Heparin
- l Standardansatz, 2 μ g/mL Rifampicin
- m Standardansatz ohne DNA
- n Standardansatz ohne RNA Polymerase II
- o Standardansatz ohne ATP

C. Abortive Initiation mit der Nukleotidkombination ATP/GTP

- g Standardansatz
- n ohne RNA Polymerase II
- m ohne DNA
- p 1 μ Ci [α - 32 P]GTP in 25 μ L Puffer (aus Pufferkonzentrat s. Material und Methoden)

- 1 pApU
- 2 ppApU
- 3 ppp(A,U)
- 4 pppUpU
- 5 ppp(A,G)
- 6 GDP
- 7 GTP

Wirkung von Inhibitoren

Zur weiteren Charakterisierung der beobachteten Dinukleotidsynthese wird der Einfluss spezifischer RNA Polymerase Inhibitoren untersucht. Ein besonders wirksamer Inhibitor der RNA Polymerase II ist das α -Amanitin. Setzt man einem Transkriptionsansatz vor Zugabe der RNA Polymerase α -Amanitin in einer Konzentration von $1 \mu\text{g/mL}$ (10^{-6} M) zu, so wird die Dinukleosidtetraphosphatsynthese fast nicht gehemmt (Fig.5.A.h; Fig.6. sowie Tab.3.). Diese Beobachtung steht in ueberraschenden Gegensatz zu der ausserordentlichen Empfindlichkeit der Synthese langkettiger RNA durch die Kalbsthymus RNA Polymerase II gegenueber einer 10^{-6} M α -Amanitinkonzentration, wobei die RNA Synthese auf 2% gedruickt wird (Tab.3.).

Tab.3. Prozentuale Hemmung der RNA- bzw. Dinukleotidsynthese durch verschiedene Inhibitoren.

Inhibitor	RNA Synthese [%]	Dinukleotid- synthese [%]
-----	100	100
1 $\mu\text{g/mL}$ α -Amanitin	2	92
2 $\mu\text{g/mL}$ Heparin		38
100 $\mu\text{g/mL}$ Heparin		6
2 $\mu\text{g/mL}$ Rifampicin		95

Die RNA Synthese ist unter den Bedingungen des Aktivitaetstests gemessen (vgl. Methoden), die Dinukleotidsynthese unter Standardbedingungen. Die Werte fuer die Dinukleotidsynthese sind aus Fig.6. berechnet.

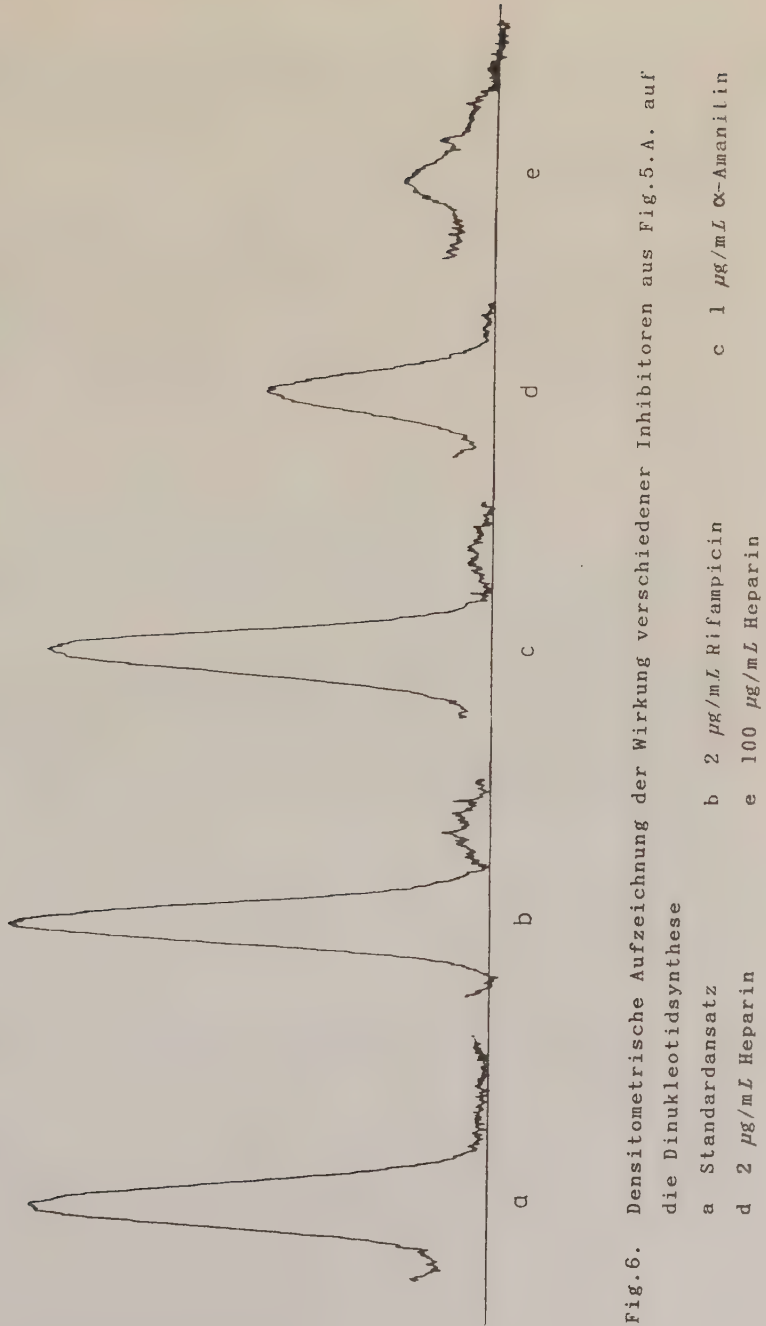


Fig. 6. Densitometrische Aufzeichnung der Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die Dinukleotidsynthese

Wie die Synthese des Dinukleosidtetraphosphats ppp(A,U) wird auch die Bildung von ApU, pApU und ppApU nicht durch α -Amanitin gehemmt (Fig.5.A.b,d,f).

Setzt man dem Dinukleotidsyntheseansatz vor Zugabe des Enzyms 2 $\mu\text{g/mL}$ Heparin zu, so werden die Dinukleotidbanden deutlich abgeschwaecht (Fig.5.A.i und Fig 6.d). Nach Kadesch und Chamberlin (1982) wird die Kalbsthymus RNA Polymerase II durch 100 $\mu\text{g/mL}$ Heparin quantitativ gehemmt und ein Versuch mit dieser Heparinkonzentration zeigt, dass die Dinukleotidsyntheserate auf 6% zurueckgeht, was nicht signifikant ueber dem Blindwert liegt (Fig.5.A.k, Fig.6.e und Tab.3.). Die Hydrolyse von UTP zu UDP bleibt unbeeinflusst (nur im Original zu erkennen), was noch einmal zeigt, dass Dinukleotidsynthese und UDP Bildung durch zwei verschiedene Enzyme katalysiert werden.

Abschliessend wird die Wirkung des Antibiotikums Rifampicin auf die Dinukleotidsynthese untersucht (Fig.5.A.l und Fig.6.b). Der Versuch mit 2 $\mu\text{g/mL}$ Rifampicin laesst keine signifikante Hemmung erkennen (Fig.6.b und Tab.3.).

Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Dinukleotidsynthese

Der bereits im letzten Kapitel verwendete Standardansatz ist das Ergebnis diverser Optimierungsversuche. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten des Dinukleotidansatzes sind dabei - hauptsaechlich am Testsystem pSmaF/SmaI, ATP/UTP - im Hinblick auf die hoechste Dinukleotidausbeute bestimmt.

Einfluss der spezifischen Aktivitaet der RNA Polymerase II

Von entscheidender Wichtigkeit sind bei der abortiven Initiation Qualitaet und Konzentration der verwendeten RNA Polymerase. Bei der saeulenchromatographischen Reinigung der Kalbsthymus RNA Polymerase II ergeben sich entsprechend dem Elutionsprofil Fraktionen mit unterschiedlich hoher Enzymaktivitaet (Fig.7.A.). Diese Aktivitaet wird dabei am Einbau von radioaktiv markiertem UMP in langkettige RNA gemessen (vgl. Methoden). Bei zu geringer Volumenaktivitaet einer Anreicherung laesst sich keine Dinukleotidsynthese nachweisen.

Kann man das Aktivitaetsprofil der Fraktionen einer RNA Polymerase Anreicherung, welches fuer die RNA Synthese aufgenommen ist, auf die Aktivitaet im Dinukleotidtest uebertragen?

Um diese Frage zu klaeren, werden je 0,03 u der einzelnen Fraktionen - also immer verschiedene Volumina - fuer eine Dinukleotidsynthese eingesetzt.

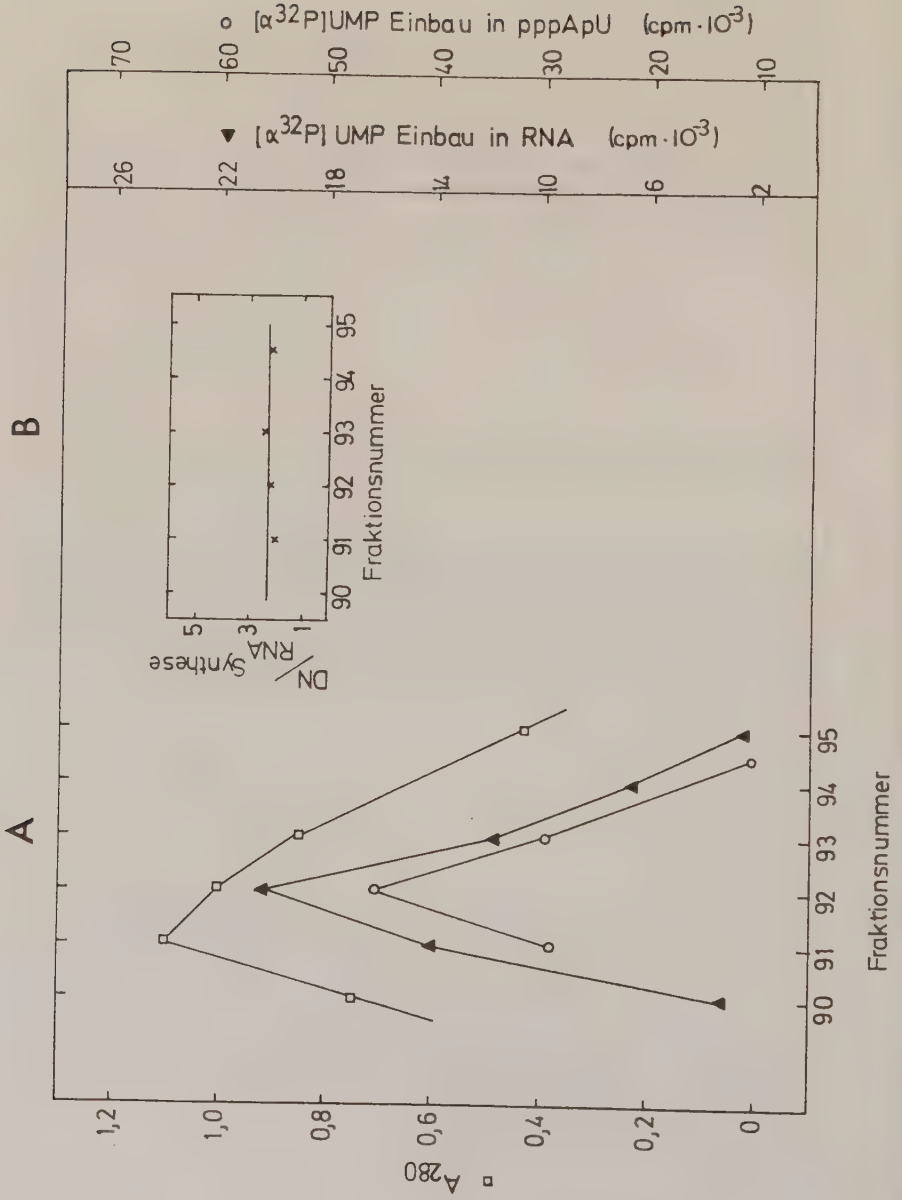


Fig.7. Aktivitaetsvergleich verschiedener Polymerasefraktionen der Phospocellulose Saeule bezueglich der RNA- und der Dinukleotidsynthese.

Die Reaktionen sind im jeweiligen Standardsystem durchgefuehrt und papierchromatogaphisch ausgewertet.

A Bei der RNA Synthese sind jeweils 10 μ L der einzelnen Fraktionen der RNA Polymerase Praeparation eingesetzt, die Dinukleotidsyntheserate ist aus Fig.7.B. auf das gleiche Volumen berechnet.

B Im jeweiligen Testsystem sind je 0,03 u RNA Polymerase eingesetzt, aufgezeichnet ist der Quotient aus Dinukleotid- und RNA Syntheserate.

Unterwirft man die gleichen Fraktionen einem Aktivitaetstest (je 10 μL) und rechnet die gebildete RNA Menge auf je 0,03 u um, so zeigt sich, dass die beiden Testsysteme ungefaehr parallele Syntheseraten aufweisen; der Quotient aus Dinukleotid- zu RNA Synthese ist relativ konstant (Fig.7.B.).

In Figur 7.A. sind fuer die RNA Synthese je gleiche Volumina (10 μL) der einzelnen Polymerasefraktionen eingesetzt, die entsprechende Dinukleotidmenge ist aus Fig.7.B. (0,03 u) jeweils auf das gleiche Volumen berechnet, und die resultierenden Aktivitaetsprofile zeigen eine optimale Synthese - sowohl von RNA als auch von Dinukleotid - fuer die RNA Polymerase Fraktion 92. Diese Uebereinstimmung zeigt, dass das Dinukleotid durch die gleiche RNA Polymerase II gebildet wird, welche auch die α -Amanitin hemmbare, langkettige RNA synthetisiert.

Die Syntheseraten von RNA- bzw. Dinukleotidsynthese lassen sich quantitativ nicht vergleichen, schon allein da diese Werte in verschiedenen Testsystemen (unterschiedliche DNA Matrizen) bestimmt sind.

In den Transkriptionsansaetzen fuer die Dinukleotidsynthese wird meist die Fraktion 92 verwendet, die Fraktion 94/95 besitzt bereits eine ungeeignet niedrige Volumenaktivitaet. Anzumerken ist hier noch, dass die Kalbsthymus RNA Polymerase II relativ unabhaengig vom pH arbeitet. Abortive Initiationen, die mit Hepes Puffern von pH 8,2 bis pH 7,0 durchgefuehrt sind, zeigen nach papierchromatographischer Analyse eine ungefaehr gleich hohe Dinukleotidsyntheserate (ohne Beleg). Die Aktivitaet der Nukleosidtriphosphat-Phosphohydrolase nimmt dagegen mit sinkendem pH deutlich zu (Fig.4.b,c).

Regenerierendes System

Die hier verwendete Kalbsthymus RNA Polymerase II Praeparation enthaelt - wie bereits erwaeht - eine basenunspezifische Nukleosidtriphosphat-Phosphohydrolase. Die Substratkonzentration wird dadurch erniedrigt und man kann folglich davon ausgehen, dass sich auch die Dinukleotidausbeute verringert.

Die RNA Synthese mit eukaryontischer RNA Polymerase II wird *in vitro* mit Hilfe von Zellextrakten durchgefuehrt, die offensichtlich auch eine derartige Hydrolase enthalten, denn in der entsprechenden Literatur ist haeufig die Verwendung von Creatinphosphat und teilweise auch Creatinphosphokinase angegeben (Tsuda & Suzuki, 1981; Samuels et al., 1982; Ernst et al., 1983; Jove & Manley, 1984). Dabei wird ATP regeneriert, und der Extrakt liefert die entsprechenden Nukleosid-mono- und -diphospho-Kinasen bzw. Creatinphosphokinase, um die uebrigen Nukleotide zu regenerieren.

Im Vergleich zu einer pppApU Synthese ohne Creatinphosphat/Creatinphosphokinase, zeigt ein Versuch mit diesem regenerierenden System eine wesentlich hoehere Menge an Dinukleotid (Fig.4.d,e). Verwendet man zusaetzlich Nukleosid-5'diphosphat Kinase und Nukleosid-monophosphat Kinase, so werden entsprechend dem Gleichgewicht die Nukleosidtriphosphate zu Diphosphaten umgewandelt, was wohl der Grund dafuer ist, dass hier die Dinukleotidmenge geringer ist als bei alleiniger Verwendung des ATP regenerierenden Systems (ohne Beleg).

In einer Reihe von Versuchen werden die Konzentrationen von Creatinphosphat und Creatinphosphokinase variiert; das Maximum der Dinukleotidsynthese liegt bei einer Creatinphosphatkonzentration von 15 mM und einer Creatinphosphokinasekonzentration von 0,3 mg/ml (Fig.8.).

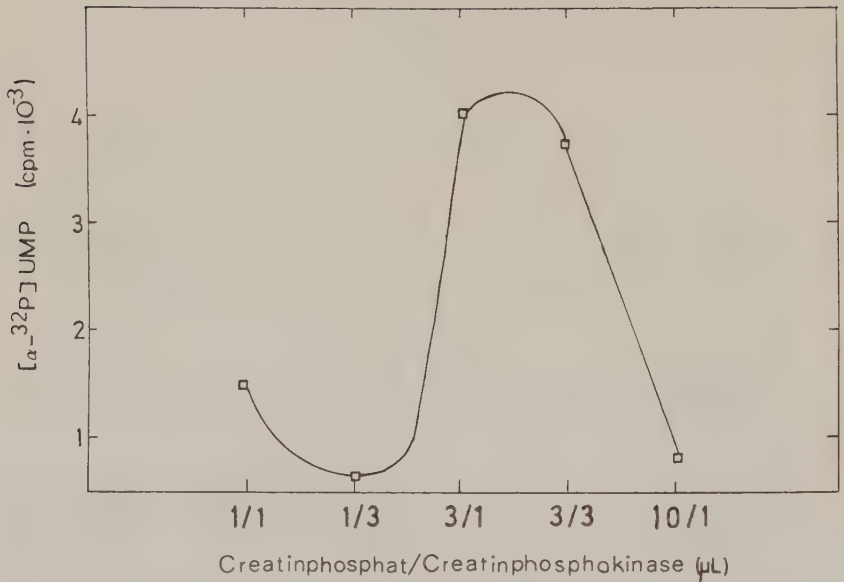


Fig.8. Abhaengigkeit der Dinukleotidsynthese vom Creatin-
system unter Standardbedingungen. Die Auswertung
erfolgt papierchromatographisch. Das Creatinphosphat
liegt in 5 mM Konzentration vor, die Creatinphospho-
kinase in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Ionenstaerke

In der Literatur wird fuer die Synthese von RNA durch Kalbsthymus RNA Polymerase II eine NaCl oder KCl Konzentration von 40-60 mM angegeben (Slattery et al. ,1983; Fire et al., 1984). Da die Enzympraeparation in einem Puffer mit 200 mM Ammoniumsulfat geloest ist, enthaelt ein Transkriptionsansatz bereits 50-60 mM Ammoniumsulfat. Die Zugabe von NaCl zeigt daher keinen grossen Effekt auf die Dinukleosidtetraphosphatsynthese (Fig.9.). Bei 60 mM NaCl ist ein leichtes Maximum zu erkennen, so dass der Standardansatz mit dieser NaCl Konzentration durchgefuehrt wird.

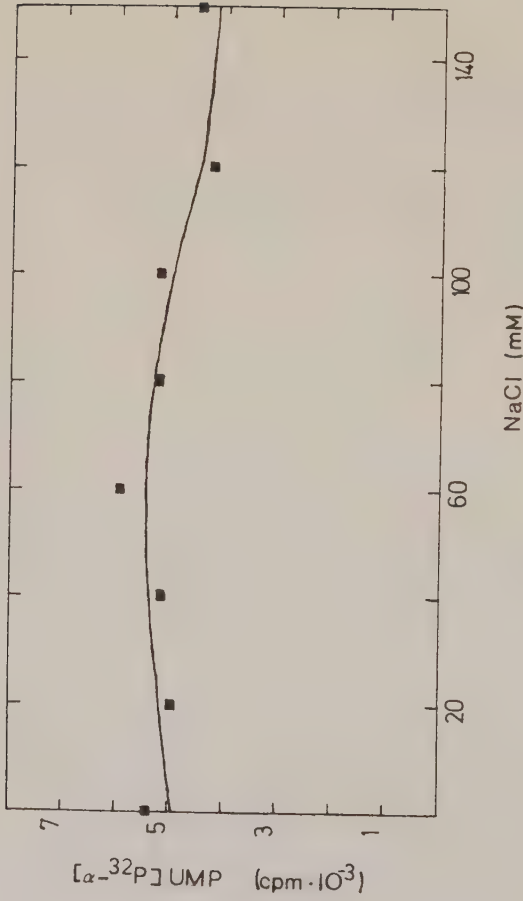


Fig. 9. Abhängigkeit der Dinukleotidsynthese von der NaCl Konzentration unter Standardbedingungen; die Auswertung erfolgt papierchromatographisch.

Zweiwertige Metallionen

Wie bei der RNA Synthese ist bei der Dinukleotidsynthese ein zweiwertiges Metallion erforderlich, ueblicherweise als Mangan- oder Magnesiumsalz.

Fuer das Plasmid pSmaF geben Weil et al. (1979) eine optimale Magnesiumchloridkonzentration von 7,5 mM fuer die spezifische Transkription an; bei der Verwendung von Manganchlorid schwankt die Konzentration mit den verschiedenen Matrizen zwischen 1 und 2,5 mM (Vaisius & Wieland, 1982; Cooke et al., 1983; Lescure et al., 1980; Lavialle et al., 1982).

Fuehrt man die Dinukleotidsynthese an pSmaF/SmaI vergleichend mit 7,5 mM Magnesiumchlorid und 1 mM Manganchlorid durch, so ergibt der Versuch mit Mn^{2+} eine 5-6 mal hoehere Dinukleotidsyntheserate wie der Magnesiumversuch (Tab.4.). Das steht im Einklang mit Versuchen zur RNA Synthese, fuer die bekannt ist, dass RNA Polymerase II mit Mangan aktiver ist als mit Magnesium (Lewis & Burgess, 1982). Andere Metallionen wie Zn^{2+} , Co^{2+} oder Ni^{2+} zeigen keinen stimulierenden Effekt, die Syntheserate erreicht ungefaehr die eines Versuches ohne Metallionenzusatz (Tab.4.).

Da Manganchlorid offensichtlich die staerkste Stimulierung der Dinukleotidsynthese bewirkt, wird durch mehrere Transkriptionsansaetze dessen optimale Konzentration bestimmt; sie liegt bei 1 mM (Fig.10.).

Tab.4. Abhaengigkeit der Dinukleotidsynthese von der Metallionenart.

Metallion	Konzentration [mM]	Dinukleotidsynthese [%]
Mn ²⁺	1	100
Mg ²⁺	7,5	17,5
Mg ²⁺	1	9,7
Ni ²⁺	1	3
Zn ²⁺	1	1
Co ²⁺	1	0
- Metallion	-	4,2

Die Syntheseraten sind auf den Standardansatz mit 1 mM Manganchlorid als 100% Wert bezogen, die Auswertung erfolgt papierchromatographisch.

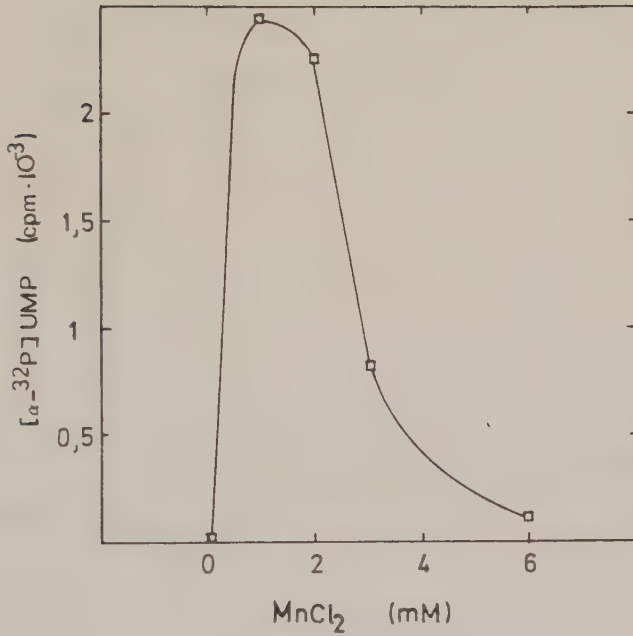


Fig.10. Abhaengigkeit der Dinukleotidsynthese von der MnCl_2 Konzentration unter Standardbedingungen; die Auswertung erfolgt papierchromatographisch.

DNA- und Polymerase Konzentration

Um bei der Dinukleotidsynthese ein optimales Verhaeltnis zwischen DNA- und Polymerasekonzentration zu finden, wird im Standardansatz die DNA Konzentration variiert, wobei konstant 4,4 μg Kalbsthymus RNA Polymerase II zugesetzt sind (Fig.11.). Die hier fuer den Standardansatz gefundene optimale DNA Konzentration liegt im Rahmen der in der Literatur fuer die RNA Synthese angegeben Werte von 0,25 bis 0,5 μg DNA/25 μL (Mishoe et al., 1984; Dignam et al., 1983). Die DNA Saettigung bei pSmaF mit 0,25 μg (0,034 pmol) auf 25 μL ist jedoch nicht uneingeschraenkt auf andere DNA Matrizen uebertragbar. Die optimale DNA Menge fuer p0,8 oder p βEH2 ,0 liegt z.B bei 0,1 pmol (ohne Beleg). Bei vergleichenden Transkriptionen verschiedener Matrizen werden daher im allgemeinen 0,1 pmol DNA auf 25 μL eingesetzt. Schwankungen in der optimalen DNA Konzentration ergeben sich z.T. durch den verschiedenen Reinheitsgrad der verwendeten Matrizen, wobei mit steigender Reinheit auch die Transkriptionseffizienz erhoeht wird (Mosig, pers.Mitt.). Fuer die RNA Polymeraseabhaengigkeit wird mit je 0,25 μg pSmaF/SmaI und steigender Menge RNA Polymerase transkribiert (Fig.12.). Aus den Graphen wird ersichtlich, dass mit 0,25 μg pSmaF auf 25 μL Testvolumen bereits eine DNA Saettigung erreicht ist, und die RNA Polymerase bis zu einer Konzentration von ungefaehr 5 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$ einen linearen Anstieg der Dinukleotidmenge bewirkt.

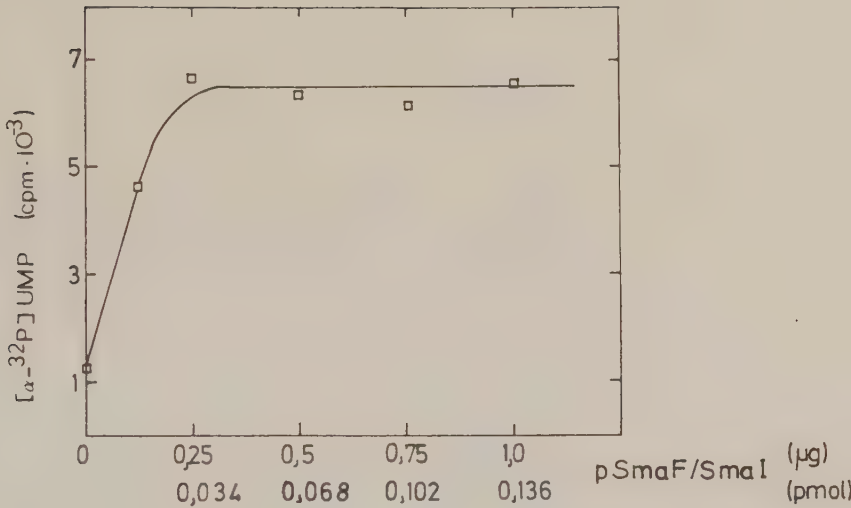


Fig.11.. Abhaengigkeit der Dinukleotidsynthese von der DNA Konzentration bei einer Polymerasekonzentration von $4,4 \mu\text{g}/25\mu\text{L}$ unter Standardbedingungen; die Auswertung erfolgt papierchromatographisch.

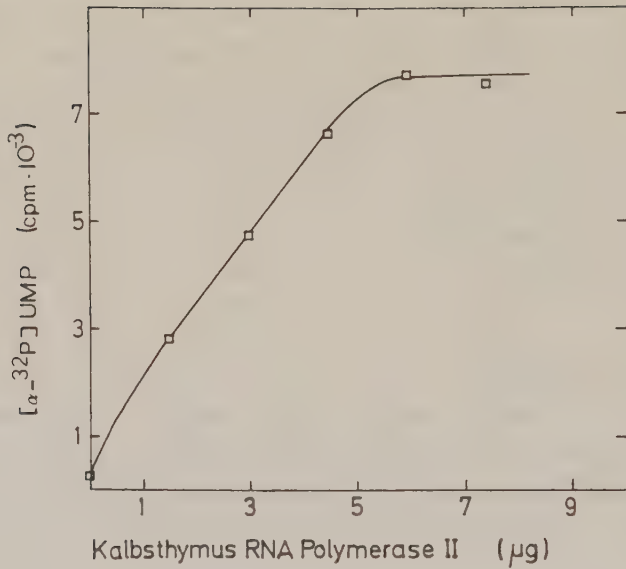


Fig.12.. Abhaengigkeit der Dinukleotidsynthese von der Polymerasekonzentration mit 0,25 $\mu\text{g}/25\mu\text{L}$ pSmaF/SmaI unter Standardbedingungen; die Auswertung erfolgt papierchromatographisch.

Inkubationszeit

Die Synthese des Dinukleotids ppp(A,U) steigt unter Standardbedingungen etwas ueber drei Stunden lang linear an, dann nimmt die Zuwachsrate ab (Fig.13.). Da die Kalbsthymus RNA Polymerase II in angereicherter Form extrem instabil ist (Halbwertszeit bei -20°C nur einige Tage; Kedinger & Chambon, 1972), kann man davon ausgehen, dass dieser Abfall nach dreistueendiger Inkubationszeit auf eine Denaturierung der RNA Polymerase zurueckzufuehren ist. Die Transkriptionsansaetze sind daher im allgemeinen drei Stunden lang bei 37°C inkubiert.

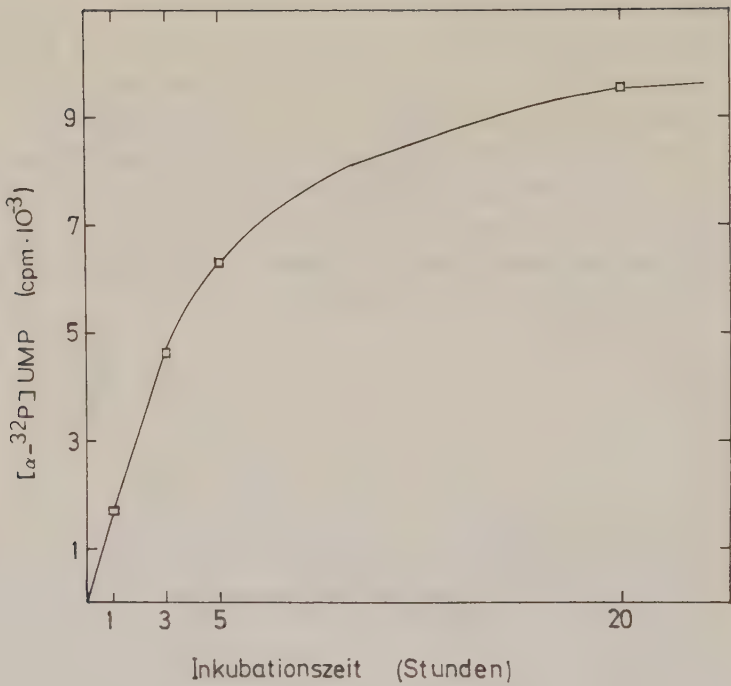


Fig.13. Abhaengigkeit der Dinukleotidsynthese von der Inkubationszeit unter Standardbedingungen; die Auswertung erfolgt papierchromatographisch.

Analyse der Spezifitaet von Kalbsthymus RNA Polymerase II bei der Dinukleotidsynthese

Gereinigte eukaryontische RNA Polymerase II galt bislang als unspezifisch (Weil et al., 1979; Dynan & Tjian, 1983a; Samuels et al., 1982). Ihre Hauptaktivitaet besteht demnach in der Synthese von RNA, die kovalent mit dem 3'-OH Ende einer DNA verknuepft ist (Lewis & Burgess, 1982).

Fuer die spezifische Synthese von RNA verwendet man einen HeLa-Ganz-Zell Extrakt oder einen Zellkernextrakt (Manley et al., 1980; Dignam et al., 1983a). Beide transkribieren mit endogener RNA Polymerase, der Zellkernextrakt wurde jedoch durch Fraktionierung von endogener RNA Polymerase befreit, so dass auch nicht homologe RNA Polymerase wie Kalbsthymus RNA Polymerase II in diesem System spezifisch transkribieren kann (Dignam et al., 1983b).

Vor kurzem erschienen allerdings einige Arbeiten ueber spezifische Transkription mit gereinigter eukaryontischer RNA Polymerase II. Tsuda & Suzuki (1982) fanden eine spezifische *in vitro* Initiation der Transkription mit Weizenkeim-, Maus- und Bombyx-RNA Polymerase II, Lescure (1983) mit Hefe RNA Polymerase II und Mishoe et al. (1984) beschrieben eine spezifische Initiation der Transkription fuer Kalbsthymus RNA Polymerase II.

Die Versuche zur Dinukleotidsynthese bei Kalbsthymus RNA Polymerase II, die ohne Zellextrakte durchgefuehrt sind, bestaetigen, dass es eine *de novo* Initiation mit dem gereinigten Enzym gibt und folglich eine Analyse seiner Spezifitaet moeglich ist.

Unter dem Begriff "Spezifitaet" soll hier zum einen verstanden werden, die Praeferenz der Kalbsthymus RNA Polymerase II fuer bestimmte Startstellen- (Promotor-) abhaengige Nukleosidtriphosphatkombinationen, zum anderen die Praeferenz des Enzyms fuer bestimmte DNA Bereiche bzw. DNA Spezies.

Initiation an verschiedenen Startstellen einer Matrize

Um zu ueberpruefen, ob die Kalbsthymus RNA Polymerase II verschiedene Startstellen auf einer DNA Matrize benutzt, und damit verschiedene Nukleotide als Substrate, ist es notwendig, neben ppp(A,U) weitere Dinukleosidtetraphosphate zu charakterisieren und ihre Synthese zu bestimmen.

Einfluss der Nukleotidkombination

Nach Mishoe et al. (1984) startet die gereinigte Kalbsthymus RNA Polymerase II spezifisch im Bereich der TATA Box des Ad 2 MLP, also vor der *in vivo* RNA Startstelle. In der Literatur gibt es bereits mehrere Hinweise auf die Bildung von Initiationskomplexen an der Goldberg-Hogness Box. So beschrieben Davison et al. (1983) die Bildung eines solchen Komplexes an der TATA Box des Ad 2 MLP bzw. des Conalbumin Gens mit Hilfe eines Hela Zellextrakts und Parker & Topol (1984) bewiesen das entsprechende fuer Initiationskomplexe an *Drosophila melanogaster* DNA mit homologen Zellextrakten. Falls diese Eigenschaft der RNA Polymerase auf weitere DNA Matrizen uebertragbar ist, sollte an fast allen eukaryontischen Promotoren (mit einer TATA Box) eine Synthese des Dinukleosidtetraphosphats ppp(A,U) moeglich sein.

Versuche an p0,8 (Sequenz: Grez et al., 1981), an pSS83 (Sequenz: Depicker et al., 1982), an pSV (Sequenz: Reddy et al., 1978), an pSSS (nicht sequenziert), an p β EH2,0 (Sequenz: Dolan et al., 1983), dem isolierten β -Globin Fragment und an Kalbsthymus DNA bestaetigen dies (Fig.14., Fig.16.).

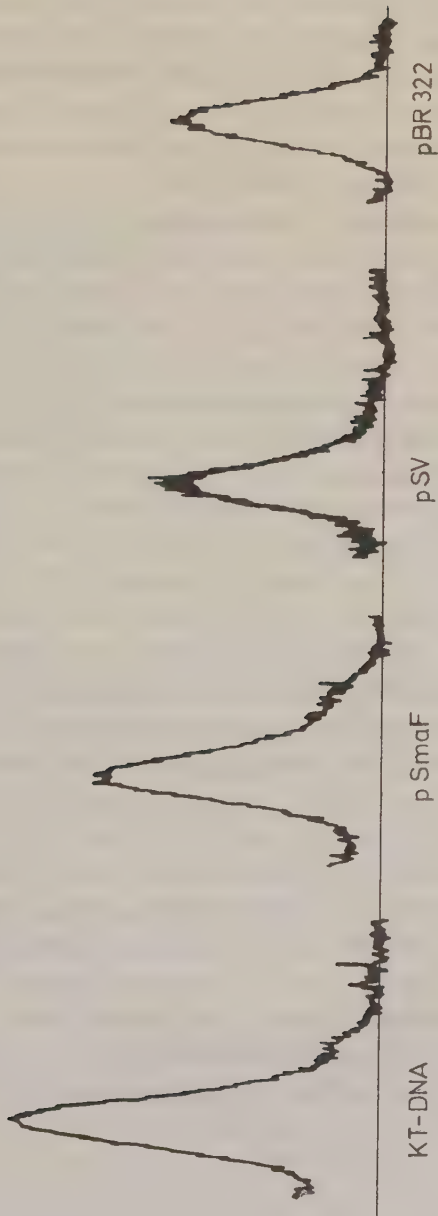


Fig.14. Densitometrische Analyse der Synthese des Dinukleotids ppp(A,U) an verschiedenen DNA Matrizen unter Standardbedingungen mit je 0,5 μ g DNA.

Aus Figur 14. laesst sich entnehmen, dass dabei die ppp(A,U) Synthese nicht auf den Vektorteil beschaenkt ist, denn pBR322 zeigt die geringste - wenn auch noch betraechtliche - Dinukleotidbildungsrate. Die Synthese am β -Globin Fragment (Fig.16.r) und an Kalbsthymus DNA (Fig.14.) bestaetigen die Transkription an rein eukaryontischer DNA.

Bei einem Start im Bereich der Goldberg-Hogness Box sind neben dem Dinukleotid pppApU die Produkte pppUpA, pppApA und teilweise pppUpU zu erwarten (vgl. Tab.11.). Wie fuer pSmaF gezeigt (Kap. Nachweis einer Dinukleotidsynthese), betraegt die pppUpA Synthese wohl nur einen Bruchteil der Gesamtsynthese von ppp(A,U). Da die eukaryontischen RNA Polymerasen II bevorzugt ein Purinderivat, besonders ATP, als Startnukleotid verwenden, ist dieser geringe Prozentsatz nicht ueberraschend (Sassone-Corsi et al., 1981).

Wahrscheinlich auf Grund des Energiebedarfs bei der spezifischen Initiation, der durch ATP gedeckt wird (Bunick et al., 1982; Sawadogo et al., 1984), ist die Synthese von pppUpU aus UTP allein (Fig.5.B.o, Fig.16.l), oder die Synthese von pppCpC aus CTP (Fig.16.j), sehr gering.

Das Dinukleosidtetraphosphat pppApA wird wie ppp(A,U) an allen getesteten DNA Matrizen gebildet, wobei hier die Plasmide pSSS (Fig.20.), p β EH2,0, pSmaF und pBR322 (Fig.19) eingesetzt sind.

Die Synthese von ppp(A,U) bzw. pppApA stellt allerdings keinen Beweis fuer Startstellenspezifitaet, d.h. Initiation im Bereich der TATAA Box, dar. Es ist denkbar, dass die RNA Polymerase mit jeder angebotenen Nukleosidtriphosphatkombination ein Dinukleotid erzeugt. Bei spezifischer Initiation an einem Promotor sollten Kombinationen vorhanden sein, die nicht zu einer Dinukleotidsynthese fuehren (unter Beruecksichtigung des ATP Bedarfs bei spezifischer Initiation, Sawadogo et al., 1984).

Bei Verwendung der Nukleotide ATP/CTP, ATP/GTP und ATP bzw. CTP oder GTP allein, waere die Synthese der Dinukleotide ppp(A,C), ppp(A,G), pppApA, pppCpC und pppGpG denkbar. Das Symbol ppp(X,Y) bedeutet dabei, dass sowohl pppXpY als auch pppYpX moeglich ist.

Auf einem Polyacrylamidgel sind daher Versuche zur abortiven Initiation an pSmaF mit den Nukleotiden ATP und CTP allein, sowie der Kombination ATP/CTP zusammengefasst, auf einem zweiten Polyacrylamidgel Versuche an p β EH_{2,0} mit der Nukleotidkombination ATP/GTP (Fig.15.). Jeweils ein Teil eines Transkriptionsansatzes wird mit alkalischer Phosphatase aus Kaelberdarm verdaut, da sich die dadurch entstehenden Dinukleosidmonophosphate nach Isolierung und Entsalzung mit Hilfe der Duennschichtchromatographie identifizieren lassen (vgl.Kap.Methoden).

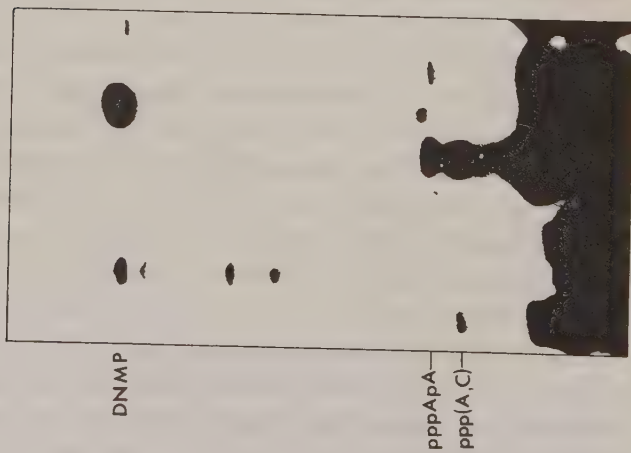
Abortive Initiation an pSmaF mit den Nukleotiden ATP und CTP

Ein Transkriptionsansatz mit [α -³²P]ATP zeigt auf der Autoradiographie eine Bande im Bereich der Dinukleosidtetraphosphate (Fig.15.g), die durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase in eine wesentlich langsamer wandernde Bande uebergeht (Fig.15.h). Das isolierte Produkt dieser Bande erweist sich als A*pA, mit einem R_f Wert von 0,30 bis 0,32 auf PEI Cellulose in 0,16 M LiCl als Fliessmittel (Tab.5.).

Die abortive Initiationsreaktion mit [α -³²P]CTP allein laesst bei gleich hoher spezifischer Radioaktivitaet keine Produkte im Bereich der Dinukleosidtetraphosphate bzw. Dinukleosidmonophosphate erkennen (Fig.15.c,d).

A

a b c d e f g h



B

i k l m n o

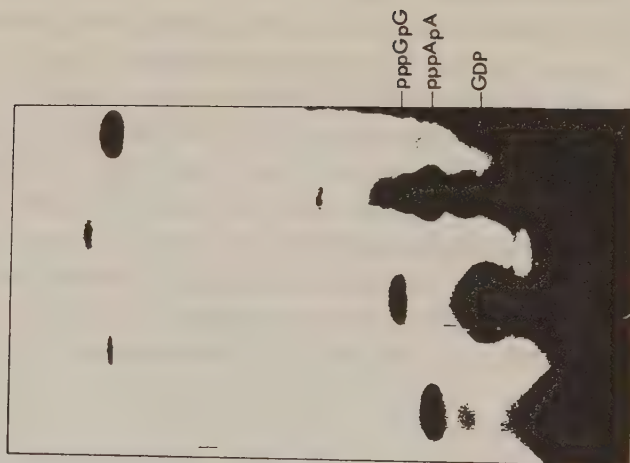


Fig.15. Charakterisierung weiterer Dinukleotide durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase.

A Versuche an pSmaF

- a,b ATP/[α - 32 P]CTP (1 μ Ci, 9 μ Ci)
- c,d [α - 32 P]CTP (0,5 μ Ci, 0,5 μ Ci)
- e,f [α - 32 P]ATP/CTP (2 μ Ci, 18 μ Ci)
- g,h [α - 32 P]ATP (0,5 μ Ci, 0,5 μ Ci)

Die Nukleotidkonzentration ist je 500 μ M; die Hoehe der radioaktiven Markierung ist in Klammern angegeben. Den vier Ansaetzen sind nach drei Stunden Inkubation Aliquots entnommen, die mit je 10 u alkalischer Phosphatase eine weitere Stunde lang inkubiert werden (b,d,f und h). Die Versuche b und f enthalten etwa die 9-fache Ansatzmenge, verglichen mit a und e, waehrend c,d,g, und h je im Verhaeltnis 1:1 aufgeteilt sind.

B Versuche an p β EH2,0

- i,k [α - 32 P]ATP (3 μ Ci, 3 μ Ci)
- l,m ATP/[α - 32 P]GTP (3 μ Ci, 3 μ Ci)
- n,o [α - 32 P]ATP/GTP (15 μ Ci, 15 μ Ci)

Die Nukleotidkonzentration ist je 500 μ M fuer das erste Nukleotid und 25 μ M fuer das zweite Nukleotid; die Hoehe der radioaktiven Markierung ist in Klammern angegeben. Jeweils die Haelfte der drei Ansaetze ist mit 10 u alkalischer Phosphatase inkubiert (k,m und o).

Tab.5. R_F Werte verschiedener Dinukleosidmonophosphate bei
duennschichtchromatographischer Analyse

Dinukleotid	R_F Werte	
	experimentell	Vergleich
CpC	0,60	0,61
CpA	0,50	0,47
ApC	0,44	0,45
ApA	0,30	0,32
ApG	0,41	0,42
GpA	0,38	0,38
GpG	0,30	0,30

Die Dinukleosidtetraphosphate sind parallel zu
den Vergleichssubstanzen in 0,16 M LiCl auf
Polyethylenimin Cellulose chromatographiert.

Bei der Inkubation von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ mit CTP ist die Bildung
der Dinukleotide $\text{pp}^*\text{pA}^*\text{pA}$, pp^*pApC , pppC^*pA und pppCpC
denkbar, wobei letzteres nicht radioaktiv markiert ist und
daher auf einer Autoradiographie nicht erkennbar. Nach
Behandlung mit alkalischer Phosphatase koennen daraus nur
die Produkte A^*pA und C^*pA radioaktiv markiert hervorgehen.

Die Inkubation von ATP mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ koennte analog zur Synthese der radioaktiv markierten Dinukleotide $\text{pp}^*\text{pC}^*\text{pC}$, pppA^*pC und pp^*pCpA fuehren, die durch 5'Phosphatabbau in die Produkte C^*pC und A^*pC uebergehen.

Bei einer abortiven Initiation mit der Nukleotidkombination ATP/CTP koennen also die folgenden, radioaktiv markierten, Produkte entstehen :

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}/\text{CTP} \rightarrow \text{pp}^*\text{pA}^*\text{pA}, \text{pp}^*\text{pApC}, \text{pppC}^*\text{pA} \rightarrow \text{A}^*\text{pA}, \text{C}^*\text{pA}$
 $\text{ATP}/[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP} \rightarrow \text{pp}^*\text{pC}^*\text{pC}, \text{pppA}^*\text{pC}, \text{pp}^*\text{pCpA} \rightarrow \text{C}^*\text{pC}, \text{A}^*\text{pC}$

Der Versuch mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}/\text{CTP}$ zeigt zwei etwa gleich intensive Dinukleosidtetraphosphat Banden, eine auf der Hoehe von $\text{pp}^*\text{pA}^*\text{pA}$ und eine darunterliegende Bande (Fig.15.e). Der gleiche Ansatz, allerdings mit neunfacher spezifischer Radioaktivitaet, ergibt nach dem Abbau mit alkalischer Phosphatase eine breite Dinukleosidmonophosphat Bande, deren Analyse die Produkte A^*pA (8487 cpm) und C^*pA (127 cpm) liefert (Fig.15.f, Tab.5.). Da der C^*pA Anteil weniger als 2 % des A^*pA Anteils ausmacht, enthaelt die Dinukleosidtetraphosphat Bande unter $\text{pp}^*\text{pA}^*\text{pA}$ neben etwas pppC^*pA in der Hauptsache ein weiteres Produkt. Moeglicherweise handelt es sich dabei um pp^*pApC , welches nach der Hydrolyse mit Phosphatase aber nicht mehr radioaktiv markiert ist.

Unter den Dinukleosidmonophosphat Banden von A^*pA und C^*pA (Fig.15.f) befinden sich drei weitere schwache Banden, von denen zwei nur etwas langsamer wandern als die Dinukleosidtetraphosphate aus Fig.15.e. Da der Teil des Ansatzes, der mit alkalischer Phosphatase inkubiert ist, etwa die neunfache Menge des Ansatzes ohne Behandlung durch alkalische Phosphatase enthaelt (Fig.15.g), koennte es sich bei diesen beiden Banden um noch nicht abgebaute

Dinukleosiddetraphosphate handeln, denn der Abbau mit alkalischer Phosphatase ist nicht vollstaendig ¹. Die weiter oben befindliche Bande ist moeglicherweise auf ein in geringer Menge entstehendes Verlaengerungsprodukt - wie z.B. pp^*pApC^*pA - zurueckzufuehren, welches durch den 5'Phosphatabbau seine radioaktive Markierung nicht verliert und wegen der neunfachen Auftragsmenge nur hier - und nicht im Ansatz ohne alkalische Phosphatase sichtbar wird.

1 Der Abbau mit alkalischer Phosphatase ist im Teil A der Fig.15. bei den Versuchen mit hoher spezifischer Radioaktivitaet nicht vollstaendig (Fig.15.b,f). Im Bereich der unumgesetzten Nukleosidtriphosphate, die wesentlich schneller als die Dinukleotide wandern, sind noch zwei Banden zu erkennen, waehrend Versuche mit weniger Radioaktivitaet (Fig.15.d,h) keine Banden in diesem Bereich mehr aufweisen. Es duerfte sich dabei um ADP und ATP handeln, da im Standardansatz auf einer Autoradiographie unter dem Dinukleosiddetraphosphatbereich UDP und UTP identifiziert werden konnten (Fig.4.). Das Nukleosiddiphosphat entsteht dabei durch die basenunspezifische Nukleosidtriphosphat-Phosphohydrolase (vgl. Kap. Charakterisierung der Reaktion).

Eine Inkubation mit ATP und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ laesst die Produkte $\text{pp}^*\text{C}^*\text{pC}$, pp^*pCpA , pppA^*pC (sichtbar) und pppApA (nicht markiert) erwarten, die durch alkalische Phosphatase in die radioaktiv markierten Dinukleosidmonophosphate C^*pC und A^*pC ueberfuehrt werden.

Die entsprechende Autoradiographie zeigt nur eine Dinukleosidtetraphosphat Bande (Fig.15.a). Nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase bilden sich zwei Dinukleosidmonophosphat Banden (Fig.15.b). Die obere, starke Bande besteht aus A^*pC (1285 cpm), die untere, schwache Bande aus C^*pC (125 cpm), (Tab.5.). Die Dinukleosidtetraphosphatbande wird folglich durch pppA^*pC hervorgerufen (Fig.15.a und Fig.16.a). Das Dinukleosidtetraphosphat $\text{pp}^*\text{pC}^*\text{pC}$ ist in Fig.15.a nicht zu erkennen, obwohl das daraus gebildete C^*pC nachweisbar ist. Das liegt daran, dass der Ansatz zur Isolierung der Dinukleosidmonophosphate (Fig.15.b) das neunfache des Vergleichsansatzes (Fig.15.a) enthaelt.

Da die in Fig.15.a auftretende pppA^*pC Bande die gleiche Mobilitaet wie die schneller wandernde Dinukleosidtetraphosphat Bande im Versuch $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}/\text{CTP}$ (Fig.15.e) aufweist, duerfte es sich bei diesem Produkt hauptsaechlich um pp^*pApC handeln.

Unter den beiden Dinukleosidmonophosphat Banden des $\text{ATP}/[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ Ansatzes (Fig.15.b) erkennt man mehrere Produkte, die auch im Vergleichsansatz ohne alkalische Phosphatase, etwas tiefer, schwach zu sehen sind (Fig.15.a). Auch hier duerfte es sich wie in Fig.15.f um Verlaengerungsprodukte handeln, die nach 5'Phosphatabbau noch radioaktiv markiert sind. Die Banden liegen etwas hoeher als im Vergleichsansatz, da wohl zum einen die hoehere Proteinmenge, und zum anderen der Phosphatabbau eine Verringerung der Mobilitaet verursachen.

Die Versuche mit der Nukleotidkombination ATP/CTP zeigen zusammenfassend, dass die Produkte pppApA und ppp(A,C)

synthetisiert werden. Da die Dinukleosidtetraphosphat Banden von pppApA und ppp(A,C) ungefaehr die gleiche Intensitaet aufweisen (Fig.15.e), nach dem Abbau mit alkalischer Phosphatase aber nur noch 1,5 % CpA bezogen auf ApA nachweisbar sind, duerfte der Grossteil der ppp(A,C) Bande aus pppApC bestehen.

Abortive Initiation an pSmaF mit den Nukleotiden ATP und GTP

Auch die Analyse der Produkte aus der abortiven Initiationsreaktion an pSmaF mit ATP/GTP ist mit zwei verschiedenen radioaktiven Markierungen durchgefuehrt, so dass folgende Dinukleotide auf einer Autoradiographie sichtbar werden koennten :

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP/GTP} \rightarrow \text{pp}^*\text{pA}^*\text{pA}, \text{pp}^*\text{pApG}, \text{pppG}^*\text{pA} \rightarrow \text{A}^*\text{pA}, \text{G}^*\text{pA}$
 $\text{ATP}/[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP} \rightarrow \text{pp}^*\text{pG}^*\text{pG}, \text{pppA}^*\text{pG}, \text{pp}^*\text{pGpA} \rightarrow \text{G}^*\text{pG}, \text{A}^*\text{pG}$

Ein Ansatz mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP/GTP}$ liefert nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase ApA (22948 cpm) und GpA (1179 cpm); ein analoger Versuch mit $\text{ATP}/[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ - aber mit der halben spezifischen Radioaktivitaet - liefert GpG (4334 cpm) und ApG (236 cpm) (ohne Beleg).

Die Dinukleosidtetraphosphat Bande, die bei Inkubation mit $\text{ATP}/[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ entsteht, wird daher durch $\text{pp}^*\text{pG}^*\text{pG}$ verursacht (Fig.16.b).

Beim Vergleich der Absolutzahlen der Dinukleotidsyntheseraten (in cpm) ist die unterschiedliche spezifische Radioaktivitaet in den einzelnen Ansaetzen zu beruecksichtigen.

Abortive Initiation an p β EH2,0 mit den Nukleotiden ATP, GTP

Verwendet man p β EH2,0 als Matrize fuer eine abortive Initiation mit der Nukleotidkombination ATP/GTP, so ergeben sich im wesentlichen die gleichen Verhaeltnisse wie an pSmaF. Eine Inkubation mit [α - 32 P]ATP ergibt ein Dinukleosidtetraphosphat (Fig.15.i), welches nach 5'Phosphatabbau in ein deutlich langsamer wanderndes Dinukleosidmonophosphat uebergeht (Fig.15.k). Die Analyse dieses Produktes zeigt, dass es sich dabei um das zu erwartende ApA handelt. Das Dinukleosidtetraphosphat ist damit als pppApA charakterisiert (Fig.15.i).

Der Versuch mit [α - 32 P]ATP/GTP ergibt eine starke Bande in Hoehe der pppApA Bande (Fig.15.i,n). Zusaetzlich erkennt man mehrere schwache Banden, bei denen es sich um andere Dinukleosidtetraphosphate handeln duerfte, die durch Ribonukleosidtriphosphat-Verunreinigungen des GTP hervorgerufen werden. Die Analyse der Dinukleosidmonophosphat Bande ergibt ApA (580,6 cpm) und GpA (15cpm) (Fig.15.o). Dieses Ergebnis spricht, ebenso wie die Abnahme der Radioaktivitaet nach Phosphatase Behandlung, dafuer, dass die Hauptbande in Fig.15.n aus pppApA besteht.

Markiert man bei der gleichen Nukleotidkombination GTP radioaktiv, allerdings mit der vierfachen spezifischen Radioaktivitaet wie im vorher beschriebenen Versuch, so entsteht eine Bande, die etwas langsamer als pppApA wandert (Fig.15.l). Die Analyse der durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase gewonnenen Dinukleosidmonophosphate zeigt, dass es sich dabei hauptsaechlich um GpG (226,7 cpm) neben etwas ApG (29,1 cpm) handelt (Fig.15.m). Die Dinukleosidtetraphosphat Bande duerfte daher auf pppGpG zurueckzufuehren sein (Fig.15.l und Fig.16.e). Das Produkt pppApG ist entweder wegen seiner geringfuegigen Synthese nicht erkennbar, oder pppGpG und ppp(A,G) besitzen die gleichen elektrophoretischen Eigenschaften.

Vergleich der abortiven Initiation mit den Nukleotiden ATP, GTP und CTP an verschiedenen Matrizen

An pSmaF sind die Dinukleosidtetraphosphate pppGpG, ppp(A,C) (siehe oben) und ppp(A,U) (vgl. Kap. Produktanalyse), die aus den Nukleotidkombinationen ATP/[α - 32 P]GTP, ATP/[α - 32 P]CTP und ATP/[α - 32 P]UTP entstehen, charakterisiert (Fig.16.a,b,c). Fuer p β EH2,0 ist das Hauptprodukt aus der Reaktion mit ATP/[α - 32 P]GTP als pppGpG charakterisiert. Daher weist die entsprechende Bande in einer Autoradiographie auch die gleiche Mobilitaet auf, wie das Produkt, welches mit dieser Nukleotidkombination an pSmaF gebildet wird (Fig.16.b,e, Bande 1). Die Nukleotidkombination ATP/[α - 32 P]CTP fuehrt an p β EH2,0 zu einem Produkt mit der gleichen Migrationsgeschwindigkeit wie ppp(A,C), welches an pSmaF synthetisiert ist, so dass es sich um das gleiche Dinukleotid handeln duerfte (Fig.16.a,d, Bande 3). Eine aehnliche Zuordnung laesst sich fuer ppp(A,U) machen, da das an p β EH2,0 aus ATP/[α - 32 P]UTP gebildete Dinukleotid mit ppp(A,U), welches an pSmaF entsteht, komigriert (Fig.16.c,f, Bande 2).

Die abortive Initiation mit der Nukleotidkombination ATP/GTP fuehrt sowohl an pSmaF als auch an p β EH2,0 bevorzugt zur Synthese der Homonukleotide, die Dinukleosiddetraphosphate ppp(A,G) werden nur geringfuegig gebildet. An pSmaF entsteht dagegen das heterogene Dinukleotid ppp(A,C) in wesentlich hoeherer Ausbeute als das Homonukleotid pppCpC (Fig.15.).

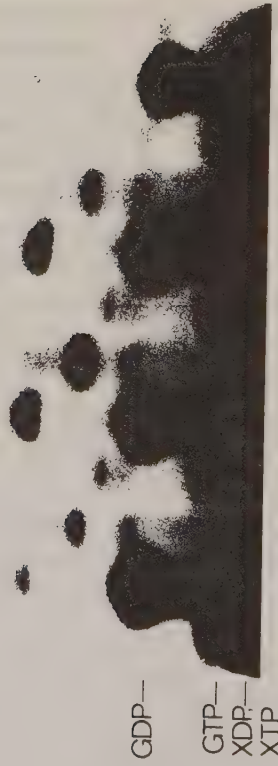
Vergleicht man die Synthese von ppp(A,C), pppGpG und ppp(A,U) an pSmaF, so nimmt in dieser Reihenfolge die Dinukleotidbildungsrate zu (Fig.16.a,b,c). An p β EH2,0 entsteht dagegen fast soviel pppGpG wie ppp(A,U), waehrend ppp(A,C) kaum gebildet wird (Fig.16.d,e,f). Setzt man das isolierte β -Globin Fragment ein, so erreicht die ppp(A,C) Bildungsrate fast die der pppGpG Bildung (Fig.16.p,q,r), die Synthese von ppp(A,U) ist jedoch eindeutig bevorzugt. An p0,8 wird erstaunlicherweise mehr pppGpG als ppp(A,U) gebildet (Fig.16.g,h,i), waehrend ppp(A,C) fast nicht entsteht und an pSSS ist fast ausschliesslich eine ppp(A,U) Synthese zu beobachten (Fig.16.m,n,o).

Die Versuche bestaetigen die bereits erwaehte ubiquitaere Bildung von ppp(A,U), zeigen aber auch, dass pppGpG/ppp(A,G) an fast allen verwendeten Matrizen gebildet wird (Ausnahme: pSSS, pBR322).

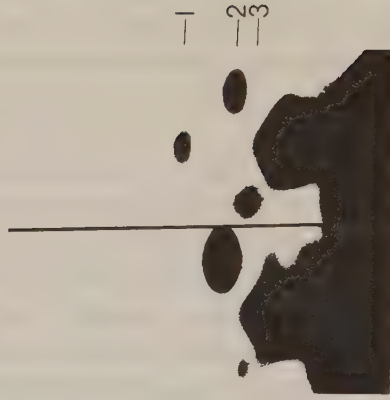
Setzt man an pBR322 die Nukleotide [α - 32 P]CTP, [α - 32 P]GTP oder [α - 32 P]UTP allein ein, so fuehrt dies nicht zu einer signifikanten Produktbildung (Fig.16.j,k,l). D.h. an diesem Vektor entsteht nicht wie an den chimaeren Plasmiden das Dinukleotid pppGpG; pppApA wird allerdings gebildet (Fig.19).

Bezogen auf eine Matrize liegt also eine Praeferenz fuer gewisse Nukleotidkombinationen vor; es werden nicht alle Dinukleotide an jeder DNA erzeugt.

a b c d e f g h i j k l m n o p q r



GDP—
GTP—
XDP—
XTP—



—
23

Fig.16. Selektive Dinukleotidbildung an verschiedenen DNA Matrizen unter Standardbedingungen mit je 0,1 pmol DNA und 1 μ Ci der radioaktiven Nukleotide :

Abortive Initiation an pSmaF

- a ATP/[α - 32 P]CTP
- b ATP/[α - 32 P]GTP
- c ATP/[α - 32 P]UTP

Abortive Initiation an p β EH2,0

- d ATP/[α - 32 P]CTP
- e ATP/[α - 32 P]GTP
- f ATP/[α - 32 P]UTP

Abortive Initiation an p0,8

- g ATP/[α - 32 P]CTP
- h ATP/[α - 32 P]GTP
- i ATP/[α - 32 P]UTP

Abortive Initiation an pBR322

- j [α - 32 P]CTP
- k [α - 32 P]GTP
- l [α - 32 P]UTP

Abortive Initiation an pSSS

- m ATP/[α - 32 P]CTP
- n ATP/[α - 32 P]GTP
- o ATP/[α - 32 P]UTP

Abortive Initiation am β -Globin Fragment

- p ATP/[α - 32 P]CTP
- q ATP/[α - 32 P]GTP
- r ATP/[α - 32 P]UTP

- 1 pppGpG, ppp(A, G)
- 2 ppp(A, U)
- 3 ppp(A, C)

Einfluss der Nukleotidkonzentration

Die Synthese von ppp(A,U) wird unter Standardbedingungen mit einer Konzentration von 500 μM ATP und 25 μM [α - ^{32}P]UTP durchgefuehrt (Tab.6.1). Markiert man, unter Beibehaltung der genannten Konzentrationsverhaeltnisse, das ATP radioaktiv (Tab.6.2), so ist die spezifische Radioaktivitaet um den Faktor 20 geringer. Auf einer Autoradiographie ist dann kein ppp(A,U) mehr zu erkennen, sondern nur noch pppApA (Fig.17.).

Auch eine Veraenderung der Nukleotidkonzentration um den Faktor 20 fuehrt zu einer (scheinbaren) Produktverschiebung. Figur 17 gibt einen Ueberblick ueber die Aenderung der Dinukleotidsynthese mit der Nukleosidtriphosphatkonzentration bzw. der spezifischen Radioaktivitaet, wobei die Ergebnisse in Tabelle 6 zusammengefasst sind.

Tab.6. Abhaengigkeit der Dinukleotidsynthese von Nukleotidkonzentration und radioaktiver Markierung.

Versuch Nr. Fig.17		Nukleotidkonzen- tration	[μM]	gebildete Dinukleotide	Creatin System
1	-	ATP	500, UTP* 25	AU*	+
2	c	ATP*	500, UTP 25	A*A*	+
3	f	ATP*	500, UTP 500	A*A*, A*U	+
4	g	ATP*	25, UTP 500	A*U	+
5	e	ATP*	500, UTP 500	A*U	-
6	k	ATP*	500, CTP 25	A*A*	+
7	i	ATP*	500, CTP 500	A*A*, A*C	+
8	h	ATP*	25, CTP 500	A*A*, A*C	+

Die Tabelle ist nach den Daten aus Fig.17.
erstellt.

Inkubiert man unter Standardbedingungen bzw. Standardkonzentrationen mit 500 μM ATP und 25 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$, so entsteht neben pppApU wahrscheinlich etwas pppUpA (vgl. Kap. Produktanalyse), aber nach den vorliegenden Ergebnissen auch pppApA (Fig.17.c), welches im Standardansatz nicht radioaktiv markiert ist (Tab.6.2). Verwendet man bei den gleichen Standardkonzentrationen $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ anstatt $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$, so wird deutlich, dass wesentlich mehr pppApA als ppp(A,U) gebildet wird, denn ppp(A,U) ist auf einer Autoradiographie nicht mehr sichtbar (Fig.17.c). Eine Nukleotidkonzentration von 25 μM fuer das zweite Nukleotid ist demnach so gering, dass die damit entstehende Dinukleotidmenge nur sichtbar ist, wenn dieses gering dosierte Nukleotid radioaktiv markiert ist (vgl. Tab.6.6). Verwendet man $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und UTP in gleicher Konzentration (Tab.6.3), so erkennt man auf einer Autoradiographie pp*pA*pA und pp*p(A,U) nebeneinander (Fig.17.f). Beruecksichtigt man die Doppelmarkierung des pp*pA*pA, so wird deutlich, dass die Affinitaet der Initiationskomplexe fuer die Kombination ATP/UTP wesentlich hoeher ist, wie fuer die Kombination ATP/ATP.

Eine Dinukleotidsynthese, bei der - im Gegensatz zu den Standardbedingungen - die Konzentration des $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 25 μM und die des UTP 500 μM ist (Tab.6.4), erzeugt auch nur die pp*p(A,U) Bande (Fig.17.g). Eine pp*pA*pA Bande wird nicht sichtbar, da wohl die Affinitaet des DNA/RNA Polymerase II Komplexes fuer ATP/ATP geringer ist.

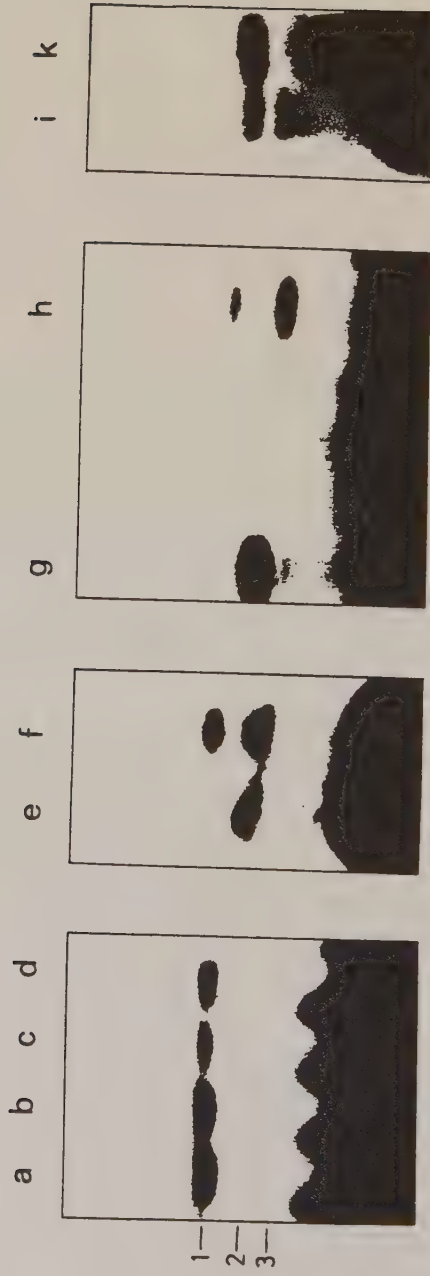


Fig.17. Einfluss der Nukleosidtriphosphatkonzentration auf die Dinukleotidsynthese unter Standardbedingungen. Eingesetzt sind die folgenden Nukleotidkonzentrationen :

- a 500 μM [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]ATP/ 25 μM CTP (6)
- b 500 μM [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]ATP/ 25 μM GTP
- c 500 μM [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]ATP/ 25 μM UTP (2)
- d 500 μM [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]ATP
- e 500 μM [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]ATP/ 500 μM UTP ohne
Creatinsystem (5)
- f 500 μM [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]ATP/ 500 μM UTP (3)
- g 25 μM [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]ATP/ 500 μM UTP (4)
- h 25 μM [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]ATP/ 500 μM CTP (8)
- i 500 μM [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]ATP/ 500 μM CTP (7)
- k 500 μM [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]ATP/ 25 μM CTP (6)

Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen den in Tab.6. angegebenen Versuchsnummern.

- 1 pppApA
- 2 ppp(A,U)
- 3 ppp(A,C)

Ein Transkriptionsansatz ohne ATP regenerierendes System zeigt trotz 500 μM ATP Konzentration nur die pp*p(A,U) Bande (Tab.6.5), d.h. dieser Versuch entspricht dem mit 25 μM ATP Konzentration und Creatinsystem (Tab.6.4), da wohl durch die Phosphohydrolase die ATP Konzentration verringert wird (Fig.17.e).

Verwendet man die Nukleotidkombination $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP/CTP}$, so ergeben sich im wesentlichen die gleichen Abhaengigkeiten (Tab.6.6,7,8). Hohe $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ - und niedrige CTP Konzentration laesst nur pppApA erkennbar werden (Fig.17.a), waehrend bei gleicher Konzentration der Nukleotide pppApA und pppApC nebeneinander sichtbar werden (Fig.17.i). Offensichtlich ist bei dieser Nukleotidkombination jedoch die Affinitaet der Initiationskomplexe fuer ATP/ATP hoeher als fuer ATP/CTP, verglichen mit der deutlichen Praeferenz von ATP/UTP gegenueber ATP/ATP, so dass trotz niedriger $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ - und hoher CTP Konzentration neben pp*p(A,C) auch etwas pp*pA*pA gebildet wird (Tab.6.8,vgl.4), (Fig.17.h). Ein Versuch mit 500 μM ATP und 25 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ zeigt in Analogie zum Standardansatz nur eine ppp(A,C) Bande (Fig.15.a).

Das Spektrum der auf einer Autoradiographie sichtbaren Dinukleotidbanden ist also abhaengig von der Nukleotidkonzentration, der spezifischen Radioaktivitaet der Nukleotide und der Affinitaet der Initiationskomplexe fuer bestimmte Nukleotidkombinationen. Diese Ergebnisse bestaetigen, dass die RNA Polymerase II auf pSmaF verschiedene Startstellen benutzt.

Einfluss von Poly(ADP-Ribose)Polymerase

Dieses Enzym ist im HeLa Zellextrakt enthalten und wurde von Slattery et al. (1983) als ein Transkriptionsfaktor daraus isoliert.

Poly(ADP-Ribose)Polymerase unterdrueckt in der RNA Synthese die unspezifische Transkription, nach Meinung von Slattery et al. durch seine Eigenschaft sich an "nicks" in der DNA anzulagern und so die "nick-katalysierte" Transkription zu verhindern. Unter "nick-katalysierter" Transkription versteht man dabei nach Lewis & Burgess (1982) zwei Vorgaenge: zum einen die Synthese von RNA, die kovalent mit RNA verknuepft ist, zum anderen eine "nick-induzierte" *de novo* RNA Synthese, die dann meist GTP als Startnukleotid verwendet.

Fuer die Dinukleotidsynthese bleibt der erste Punkt ausser Betracht, aber es stellt sich die Frage, ob der Transkriptionsfaktor, vielleicht im Sinn von Punkt zwei, einen Einfluss auf die Dinukleotidsynthese zeigt. Inkubiert man einen Transkriptionsansatz mit 0,5 u Poly(ADP-Ribose) Polymerase¹ so zeigt sich tatsaechlich ein Effekt. Bei der abortiven Initiation an p0,8 und pSmaF mit jeweils den Nukleotidkombinationen ATP/CTP, ATP/GTP und ATP/UTP veraendert sich die Dinukleotidbildung selektiv in der Weise, dass jeweils die Synthese von ppp(A,U) gehemmt ist (Fig.18.). Die Synthese von pppGpG, ppp(A,G) und ppp(A,C) bleibt dagegen unbeeinflusst.

¹ Das Enzym wurde mir freundlicherweise von Prof.Dr.H.Hilz, Hamburg in einer Konzentration von 0,1 u/ μ L zur Verfuegung gestellt.

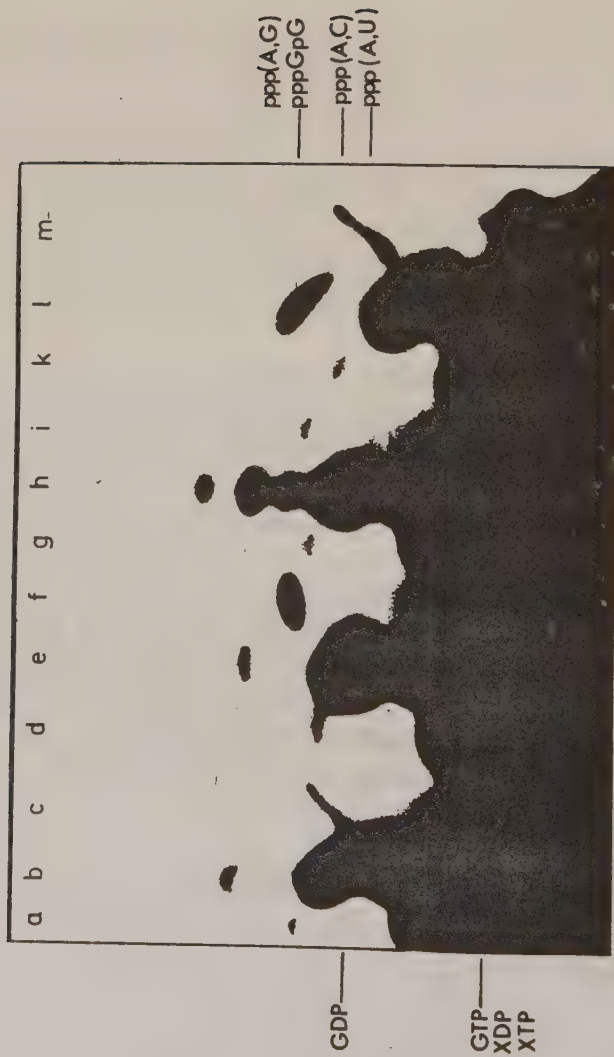


Fig.18. Einfluss von Poly(ADP-Ribose)Polymerase auf die Dinukleotidsynthese unter Standardbedingungen. Das Enzym ist in einer Konzentration von 0,5 u auf 25 μ L zugegeben.

Abortive Initiation an pSmaF

Nukleotidkombination ATP/[α - 32 P]CTP

a mit PARP

d ohne PARP

Nukleotidkombination ATP/[α - 32 P]GTP

b mit PARP

e ohne PARP

Nukleotidkombination ATP/[α - 32 P]UTP

c mit PARP

f ohne PARP

Abortive Initiation an p0,8

Nukleotidkombination ATP/[α - 32 P]CTP

g mit PARP

k ohne PARP

Nukleotidkombination ATP/[α - 32 P]GTP

h mit PARP

l ohne PARP

Nukleotidkombination ATP/[α - 32 P]UTP

i mit PARP

m ohne PARP

PARP = Poly(ADP-Ribose)Polymerase

XDP = CDP, UDP

XTP = CTP, UTP

Einfluss von Magnesium und Superhelikalitaet

Nach Laviaille et al. (1982) ist die mRNA Synthese in Gegenwart von Mn^{2+} spezifischer als mit Mg^{2+} , in der Literatur ist aber auch die gegenteilige Meinung zu finden (Lewis & Burgess, 1982). Danach bewirkt Mn^{2+} durch seine Bindung an das N-7 Atom des Guanins eine Destabilisierung der DNA Doppelhelix. RNA Ketten, die hier initiiert werden, starten meistens mit GTP.

Die *in vitro* mRNA Synthese ist an superhelikaler DNA wesentlich effizienter als an geschnittener DNA (Pedone & Ballario, 1984; Lewis & Burgess, 1982 und Referenzen darin). Zu beruecksichtigen ist dabei allerdings, dass bei superhelikalen chimaeren Plasmiden die eukaryontischen Insertionen durch topologische Veraenderungen die Transkription an den prokaryontischen Vektorsequenzen beeinflussen (Carnevali et al., 1983).

Um den Einfluss dieser zwei Parameter auf die Spezifitaet der Dinukleotidsynthese zu pruefen, wird an den Matrizen p β EH2,0, pSmaF und pBR322 die Abhaengigkeit der Synthese von pppApA verfolgt (Fig.19.).

Mit Manganchlorid ist die pppApA Bildungsrate an linearer DNA an p β EH2,0 staerker als an pSmaF und diese staerker als an pBR322 (Fig.19.1). Vergleicht man damit die Synthese in Gegenwart von Magnesiumchlorid, so ist auch hier die pppApA Bildung an pSmaF hoeher als an pBR322; die Syntheserate an p β EH2,0 faellt allerdings aus der Reihe (Fig.19.3). Die Spezifitaet der Dinukleotidsynthese scheint also nicht von Metallionen abhaengig zu sein. Quantitative Unterschiede sind allerdings vorhanden; mit Mn^{2+} wird deutlich mehr Dinukleotid gebildet als mit Mg^{2+} (vgl.Kap. Zweiwertige Metallionen).

Setzt man die gleichen Matrizen ungeschnitten ein, so ergibt sich mit Manganchlorid eine in etwa gleich hohe Syntheserate an p β EH2,0 und pSmaF, waehrend die an pBR322 geringer ist (Fig.19.2). Auch eine Versuchsreihe mit Magnesiumchlorid und superhelikaler DNA liefert die gleiche Reihenfolge in der Transkriptionseffizienz (ohne Beleg).

p β EH2,0 ist mit EcoRI (5'ueberhaengende Enden) und HindIII (5'ueberhaengende Enden), pSmaF mit SmaI (blunt) und pBR322 mit BamHI (5'ueberhaengende Enden) verdaut. Bei einer bevorzugten Initiation der Dinukleotidsynthese an den 3'-OH Enden der entstehenden Fragmente sollte die relative Transkriptionseffizienz an den superhelikalen Plasmiden eine andere Reihenfolge ergeben, als an den geschnittenen, d.h. pSmaF/SmaI sollte die geringste Initiationsrate aufzeigen. Durch die gleiche Abstufung der Transkriptionseffizienz mit superhelikaler und linearer DNA laesst sich eine Initiation der Dinukleotidsynthese an spezifischen "nicks" oder Enden der DNA, die durch die verschiedenen Restriktionsenzyme erzeugt werden, ausschliessen (vgl.dazu Lewis & Burgess, 1982).

Die Dinukleotidsyntheseraten lassen also keinen qualitativen Einfluss der Parameter "Metallion" und "Zustand der DNA" auf die Dinukleotidsynthese erkennen, was in Tab.7. noch einmal zusammenfassend gezeigt ist.

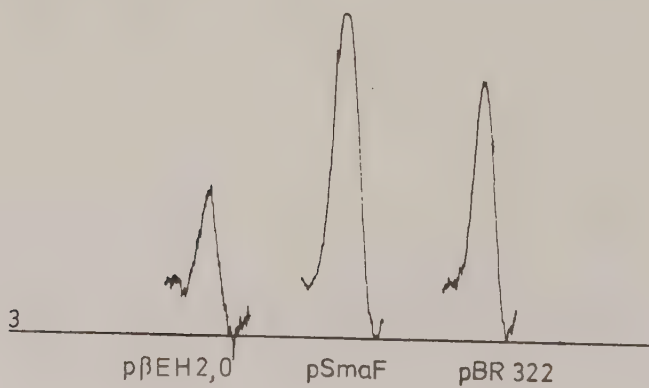
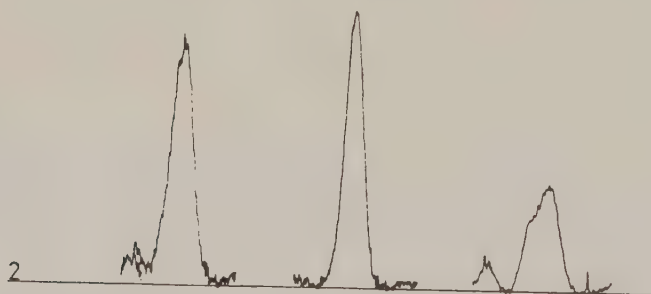
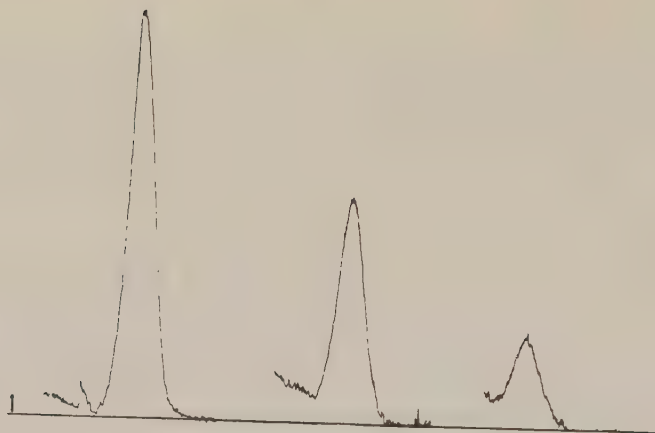


Fig.19. Densitometrische Analyse der Abhaengigkeit der pppApA Syntheserate von der Metallionenart und dem Zustand der DNA, gemessen an verschiedenen Matrizen :

- 1 lineare DNA, $MnCl_2$
- 2 superhelikale DNA, $MnCl_2$
- 3 lineare DNA, $MgCl_2$

Die Versuche sind mit je 0,1 pmol DNA und 1mM Manganchlorid bzw. 10 mM Magnesiumchlorid durchgefuehrt.

p β EH2,0 ist mit EcoRI und HindIII, pSmaF mit SmaI und pBR322 mit BamHI geschnitten.

Tab.7. Einfluss von Magnesium und Superhelikalitaet auf die Dinukleotidsynthese an verschiedenen DNA Matrizen.

Versuch	Metallion	Zustand der DNA	pppApA Synthese
1	Mn ²⁺	linear	G > S > B
2	Mn ²⁺	superhelikal	G = S > B
3	Mg ²⁺	linear	S > B (>G)

G = pPEH2,0 geschnitten mit EcoRI und HindIII

S = pSmaF geschnitten mit SmaI

B = pBR322 geschnitten mit BamHI

Die Versuche sind mit je 0,1 pmol DNA und 1mM Manganchlorid bzw. 10 mM Magnesiumchlorid durchgefuehrt.

Die Daten sind aus Fig.19. erstellt.

Initiation an verschiedenen DNA Bereichen

Die untersuchte Dinukleotidsynthese wird im allgemeinen an chimären Plasmiden durchgefuehrt, bei denen das eukaryontische Fragment durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten ist. Transkribiert nun die gereinigte Kalbsthymus RNA Polymerase II nur dieses eukaryontische oder auch das prokaryontische DNA Fragment ?

Eukaryontische RNA Polymerase II kann, wie bereits erwachnt, Initiationskomplexe an den Goldberg-Hogness Boxes eukaryontischer Gene ausbilden (Davison et al., 1983; Parker & Topol, 1984; Mishoe et al., 1984), aber sie kann auch - falls keine oder eine defekte TATA Box vorliegt - ersatzweise an TATA Regionen des Vektors (pBR322)

Initiationskomplexe erzeugen (Davison et al., 1983). Diese Initiationskomplexe fuehren allerdings nicht zur *in vitro* RNA Synthese. Ein Versuch mit den isolierten Fragmenten von pSmaF, pBR313 und SmaF, soll zeigen, ob eine Initiation am Vektor erfolgt, die zur Dinukleotidsynthese fuehrt oder ob das Enzym spezifisch am SmaF Fragment, welches einen starken Promotor fuer Saeugetier RNA Polymerase enthaelt (Wasylik et al., 1980) transkribiert. Setzt man die beiden DNA Fragmente ungefaehr equimolar, d.h. in verschiedenen μg Mengen, ein, so wird am prokaryontischen pBR313 Fragment unter Standardbedingungen ungefaehr 1,4 mal soviel ppp(A,U) synthetisiert wie am SmaF Fragment (Tab.8.).

Die Dinukleosiddetraphosphatsynthese findet also nicht ausschliesslich am eukaryontischen Fragment statt. Aus dem Verhaeltnis der synthetisierten Dinukleotidmenge zu der eingesetzten DNA Menge in μg erkennt man jedoch, dass die Dinukleotidsyntheserate nicht parallel mit der DNA Laenge ansteigt. Es liegt also keine statistische Initiation vor.

Tab.8. Dinukleotidsynthese an Fragmenten von pSmaF.

DNA	pmol DNA	μg DNA	cpm	pmol DN· $\text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ DNA
pBR313 Fragment	0,1	0,50	4201	5,6
SmaF Fragment	0,1	0,16	3064	12,8
pSmaF/SmaI	0,1	0,75	7654	6,8

Die synthetisierte Menge an ppp(A,U) ist am Einbau von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UMP}$ in cpm gemessen; dabei entspricht 1 pmol UMP circa 500 cpm.

Bezogen auf eine Zeiteinheit und die eingesetzte Menge DNA entsteht am SmaF Fragment mehr als doppelt so viel Dinukleotid (in pmol) wie am prokaryontischen Fragment (Tab.9.). Auffallend ist, dass sich die an den isolierten Fragmenten gebildeten Dinukleotidmengen annähernd additiv verhalten: pSmaF = 100%, pBR313 + SmaF = 95%. Auch das spricht gegen eine statistische Initiation, da bei gleicher Menge eingesetzter RNA Polymerase II an den isolierten Fragmenten (0,5 bzw. 0,16 μg DNA) nicht die gleiche Menge Dinukleotid entsteht wie am ganzen Plasmid (0,75 μg) (Tab.8.).

Fuehrt man an den isolierten Fragmenten von p β EH2,0 (2300 Bp β -Globin Fragment + 4332 Bp Vektor), in jeweils equimolaren Mengen, Dinukleotidsynthesen durch, so zeigt sich, dass hier etwas mehr Dinukleotid am eukaryontischen als am prokaryontischen Fragment gebildet wird, d.h. bezogen auf eine definierte DNA Laenge wird auch hier am eukaryontischen Teil etwa doppelt soviel Dinukleotid erzeugt wie am Vektor (Fig.22.).

Anders als bei der RNA Synthese (Davison et al., 1983; Mishoe et al., 1984), tritt also bei der Dinukleotidsynthese auch eine Produktbildung am prokaryontischen Fragment chimaerer Plasmide auf, die bei quantitativen Aussagen, u.U. als Blindwert, beruecksichtigt werden muss.

Initiation an verschiedenen DNA Spezies

Das eukaryontische Transkriptionssystem verfuegt offenbar ueber eine Speziespezifitaet, d.h. die endogene RNA Polymerase eines Zellextrakts transkribiert ihre homologe DNA wesentlich effizienter als eine heterologe (Tsuda & Suzuki, 1981; Triadou et al., 1983). Tsuda und Suzuki haben z.B. festgestellt, dass im HeLa Zellsystem die DNA des Maus β -Globin Gens und die des Seidenraupenfibroin Gens deutlich schlechter als Adenovirus 2 DNA transkribiert werden. Umgekehrt liest die endogene RNA Polymerase eines Seidenraupenextrakts kaum β -Globin- und Adenovirus 2 DNA ab. Diese Speziespezifitaet wird moeglicherweise durch bestimmte DNA-bindende Proteine verursacht, wie den promotorspezifischen Faktor Spl bei der SV 40 Transkription (Dyana & Tjian, 1983b). Auch im RNA Polymerase I System ist ein speziespezifischer Transkriptionsfaktor bekannt, der allerdings nur schwer von der RNA Polymerase I abzutrennen ist (Grummt, pers. Mitteilung).

Um zu pruefen, ob gereinigte Kalbsthymus RNA Polymerase II (noch) ueber eine Speziespezifitaet verfuegt, oder ob diese nur durch zusaetzliche Proteinfaktoren zu erreichen ist, wird die Dinukleotidsynthese an verschiedenen Matrizen durchgefuehrt.

Bei einer Speziespezifitaet waere eine Abstufung in der Reihe homologe Kalbsthymus DNA > tierische DNA > pflanzliche DNA zu erwarten, wobei p β EH2,0 (Huhn) und p0,8 (Huhn) als tierische DNA und pSS83 (Ti Plasmid aus *Agrobacterium tumefaciens*) und pSSS (Mais) als pflanzliche DNA verwendet sind. Mit in den Vergleich einbezogen sind die Plasmide pSmaF (Ad2) und pSV (SV40) mit viraler DNA sowie pBR322. Da bei diesem Vergleich die Dinukleotidsynthese quantitativ ausgewertet wird, ist fuer jede DNA Spezies (Ausnahme: Kalbsthymus DNA) in Vorversuchen die DNA Saettigung der Polymerase bestimmt worden. Dadurch werden DNA

Konzentrationseffekte ausgeschaltet. Der Vergleich impliziert allerdings, dass die verschiedenen DNA Matrizen in gleicher Reinheit vorliegen, d.h. dem Enzym gleich gut zugaengig sind, und dass am jeweiligen prokaryontischen Vektorfragment in etwa die gleiche Syntheserate auftritt. Zu beruecksichtigen dabei ist, dass die Dinukleotidsynthese an Kalbsthymus DNA - im Gegensatz zu der an Plasmiden - ausschliesslich an eukaryontischer DNA initiiert wird. Fuer die Versuche sind die Nukleosidtriphosphatkombinationen ATP/UTP, ATP allein und ATP/GTP gewaehlt, da an allen verwendeten DNA Matrizen die Dinukleotide ppp(A,U) bzw. pppApA, und mit Ausnahme von pSSS auch pppGpG bzw. ppp(A,G) synthetisiert werden (Fig.16., 17., 19.). Inkubiert man Kalbsthymus DNA, pSmaF, pSV und pBR322 unter Standardbedingungen mit der Kombination ATP/UTP, so laesst sich folgende Abstufung in der Transkriptionsaktivitaet erkennen (Fig.14.):

Kalbsthymus DNA > pSmaF > pSV > pBR322

Fuer diese begrenzte Anzahl von getesteten Matrizen scheint die homologe Kalbsthymus DNA bevorzugt zu sein, denn hier ist keine Synthese am Vektor impliziert.

Eine weitere Abstufung, in der Weise, dass Saeugetier DNA gegenueber pflanzlicher DNA bevorzugt transkribiert wird, laesst sich nicht erkennen.

Die Synthese von pppApA ist zwar am β -Globin Fragment (Huhn) hoeher als an pSSS (Mais) (Fig.20.), andererseits entsteht aber bei der Synthese von ppp(A,U) am Plasmid pSSS mehr Dinukleotid als am isolierten β -Globin Fragment (Fig.16.o,r). Quantitative Vergleiche sind in diesen beiden Faellen jedoch eingeschraenkt, da die Syntheserate am Vektor unbekannt ist.

Verwendet man die Nukleotidkombination ATP/GTP, so ergibt sich die folgende Reihe in der Initiationseffizienz (Fig.21.):

$$\text{pSS83} > \text{p0,8} = \text{pSmaF} = \text{KT DNA}^1 > \text{pBR322} > \text{pSV} > \\ \text{p}\beta\text{EH2,0} > \text{pSSS}$$

In dieser Reihe laesst sich keine Speziesspezifitaet erkennen. Die Praeferenz fuer die homologe DNA wird also nur bei der Synthese von ppp(A,U) deutlich.

¹ fuer Kalbsthymus (KT) DNA ist keine Saettigungskurve erstellt, der Ansatz enthaelt daher u.U. mit 0,5 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$ zu wenig DNA.

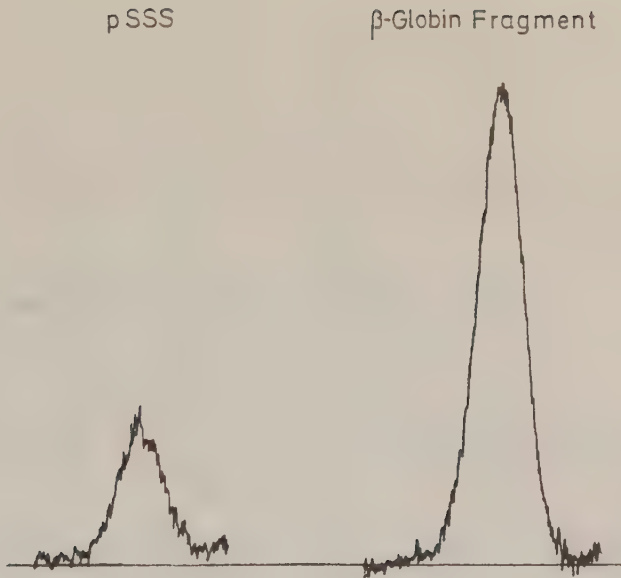


Fig.20. Densitometrische Analyse der Synthese des Dinukleotids pppApA an pSSS und dem β -Globin Fragment unter Standardbedingungen. Eingesetzt ist je 0,1 pmol DNA.

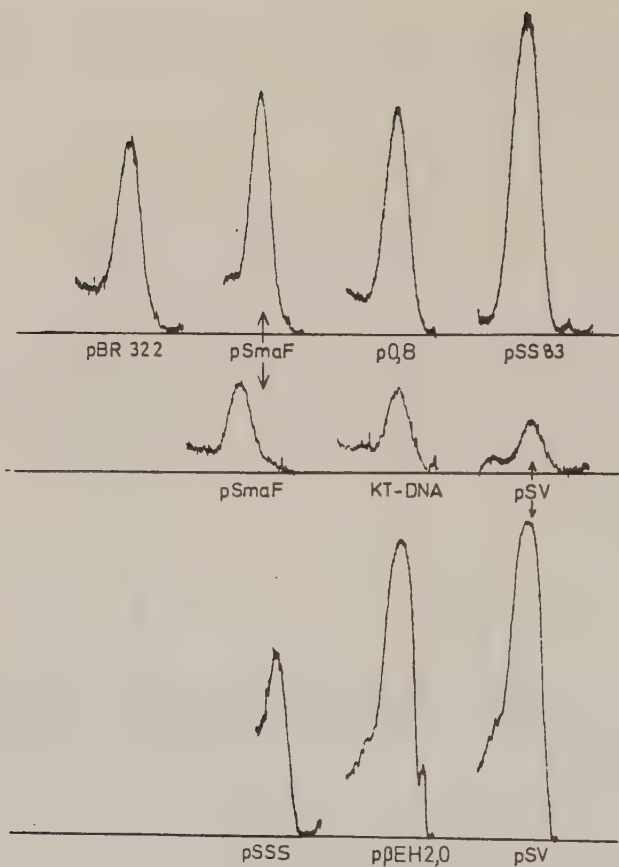


Fig. 21. Densitometrische Analyse der Synthese der Dinukleotide pppGpG/ppp(A,G) an verschiedenen DNA Matrizen

Eingesetzt sind je Versuch 0,5 μg DNA. Die drei Zeilen entsprechen drei verschiedenen Autoradiographien. Die synthetisierten Dinukleotidmengen koennen ueber pSmaF und pSV, die auf jeweils zwei Autoradiographien erscheinen (s. Pfeile), quantitativ in Bezug gesetzt werden.

Vergleich der Kalbsthymus- und Weizenkeim RNA Polymerase II

Isoliert man aus dem chimaeren Plasmid pSmaF das eukaryontische Fragment SmaF und das prokaryontische Fragment pBR313, so ergibt die jeweilige Transkriptionsreaktion mit den zwei Nukleotiden ATP/[α - 32 P]UTP bei Verwendung des Kalbsthymusenzymzums ungefaehr 42% pp*p(A,U) an SmaF bezogen auf die Gesamtsynthese an geschnittenem Plasmid, waehrend das pflanzliche Enzym in diesem Fall weniger als 5% Dinukleosidtetraphosphat erzeugt (Schaeffner, 1984). Dies mag an einer Enzym-Speziesspezifitaet liegen, wie sie fuer die RNA Synthese bekannt ist. Wasylik et al. (1980) haben gezeigt, dass Weizenkeim RNA Polymerase II weder an Adenovirus 2 DNA noch am Conalbumin Gen spezifische Transkripte synthetisiert.

Ergibt folglich ein Dinukleotidtest eine hoehere Syntheserate des Weizenkeimenzymzums an pflanzlicher DNA bzw. das Kalbsthymusenzym mehr Dinukleotid an tierischer DNA ?

Zwei RNA Polymerasen koennen bei der (abortiven) Initiation allerdings nur dann verglichen werden, wenn sie in gleicher Aktivitaet vorliegen. Da jedes Enzym unter anderen Bedingungen optimal arbeitet, sind die Enzymaktivitaeten auf die Bedingungen fuer Kalbsthymus RNA Polymerase II normiert (vgl. Wasylik et al., 1980). Die jeweils eingesetzte Menge RNA Polymerase II ist in den folgenden Versuchen so bestimmt, dass nach dem Standardaktivitaetstest, der die Synthese von RNA an Kalbsthymus DNA verfolgt, immer 0,055 u Enzymaktivitaet auf 25 μ L eingesetzt sind.

Die verschiedenen DNA Matrizen sind equimolar in einer Konzentration eingesetzt, bei der die jeweilige DNA Saettigung erreicht ist. Da die Plasmide pSSS und p β EH2,0 den gleichen Vektor (pBR322) enthalten, ist auch ein direkter Vergleich der Dinukleotidsynthesen an den

geschnittenen Plasmiden - nicht nur der isolierten Fragmente - moeglich, wenn man voraussetzt, dass beide Plasmide in gleicher Reinheit vorliegen.

Fuehrt man an den isolierten Fragmenten von pSSS (Mais) und p β EH2,0 (Huhn) Dinukleotidsynthesen mit Kalbsthymus- und Weizenkeim RNA Polymerase II durch, so werden mit der Nukleotidkombination ATP/[α - 32 P]GTP an allen Fragmenten die Dinukleotide pppGpG bzw. ppp(A,G) gebildet (Fig.22.).

An den eukaryontischen Fragmenten synthetisieren dabei beide Enzyme in etwa gleich viel Dinukleotid wie am prokaryontischen Vektorfragment (Fig.22.A. und B.).

D.h. bezogen auf die jeweilige Gesamtsyntheserate an eukaryontischer + prokaryontischer DNA, ergeben sich fuer das β -Globin - bzw. SSS-Fragment ungefaehr 50% der Dinukleotidmenge, unabhaengig von der transkribierenden RNA Polymerase (Tab.9.).

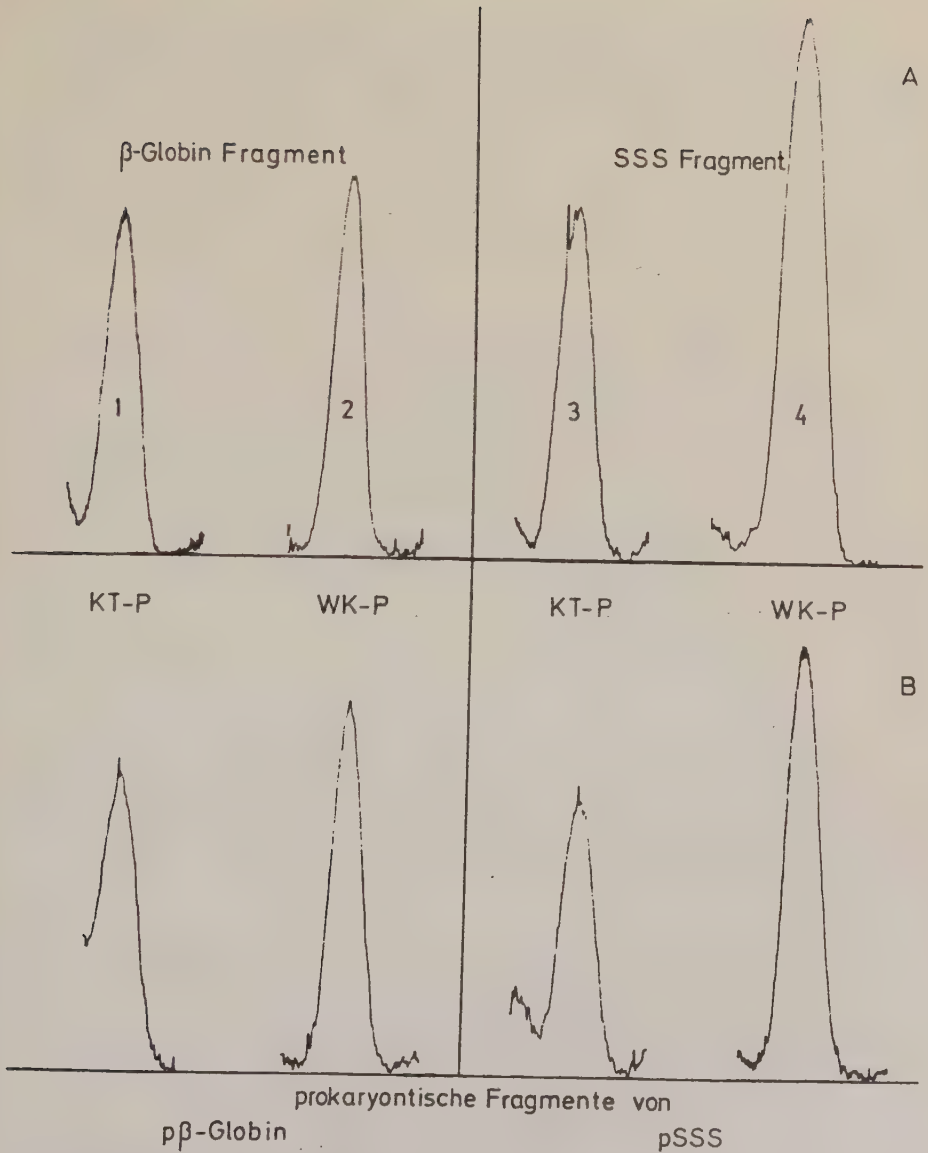


Fig.22. Densitometrische Analyse der Synthese der Dinukleotide pppGpG bzw. ppp(A,G). Eingesetzt sind je 0,1 pmol der isolierten Fragmente von pSSS und p β EH2,0 und je 0,5 u Kalbsthymus- und Weizenkeim RNA Polymerase II.

Tab.9. Dinukleotidsynthese von Kalbsthymus- und Weizenkeim RNA Polymerase II an eukaryontischer DNA bezogen auf die Gesamtsynthese am Plasmid.

Enzym	Synthese von pppGpG, ppp(A,G) am Fragment: β -Globin	Synthese von ppp(A,U) am Fragment: SSS	SmaF
KT-P	53 %	56 %	42 % ¹
WK-P	51 %	56 %	< 4,8 % ²

¹ Dieser Wert ist aus Tab.8. berechnet.

² Dieser Wert wurde der Diplomarbeit von Schaeffner (1984) entnommen.

Die Prozentsätze beziehen sich jeweils auf die Gesamtsynthese am geschnittenen Plasmid; d.h.

Dinukleotidsynthese am eukaryontischen +

prokaryontischen Fragment = 100 %.

Die Tabellenwerte sind aus Fig.22. berechnet.

Dieser Gegensatz zu der deutlich verschiedenen Initiationseffizienz der beiden RNA Polymerasen am SmaF Fragment ergibt sich möglicherweise aus der Wahl der Nukleotidkombination ATP/GTP anstatt ATP/UTP.

Die abortive Initiation an dem eukaryontischen Fragment von p β EH2,0 ergibt mit Kalbsthymus- und Weizenkeim RNA Polymerase II ungefaehr gleich hohe Mengen von pppGpG/ppp(A,G), waehrend am SSS Fragment mit dem pflanzlichen Enzym mehr Dinukleotid entsteht als mit dem tierischen Enzym (Fig.22.A.). Ein Vergleich der Dinukleotidsyntheseraten an den eukaryontischen Fragmenten zeigt also, dass die Weizenkeim RNA Polymerase II an Mais DNA (SSS) aktiver ist als am β -Globinfragment (Huhn) (Fig.22.A.2,4). Kalbsthymus RNA Polymerase II scheint

dagegen in diesem Fall nicht zwischen pflanzlicher und Saeugetier DNA zu differenzieren (Fig.22.A.1,3). Die folgende Tabelle gibt einen Ueberblick ueber die quantitativen Verhaeltnisse in Fig.22. (Tab.10.).

Tab.10. Dinukleotidsynthese von Kalbsthymus- und Weizenkeim RNA Polymerase II an den eukaryontischen Fragmenten von p β EH2,0 und pSSS.

Enzym	gebildete Menge pppGpG/ppp(A,G) in willkuerlichen Einheiten	
	β -Globin Fragment	SSS Fragment
KT-P	8,8 (Peak 1)	9,2 (Peak 3)
WK-P	9,4 (Peak 2)	17,0 (Peak 4)

Die Tabellenwerte sind aus Fig.22. berechnet.

Diskussion

Spezifische Transkriptionen mit Kalbsthymus RNA Polymerase II werden im allgemeinen mit Hilfe von Zellextrakten (Manley et al., 1980; Dignam et al., 1983a) durchgefuehrt, da das gereinigte Enzym den groessten Teil der synthetisierten RNA an den 3'-OH Enden der eingesetzten DNA initiiert (Dreyer & Hausen, 1976).

Trotzdem ist die *de novo* Synthese von Dinukleosid-tetraphosphaten, in einer abortiven Initiationsreaktion, wie sie fuer prokaryontische RNA Polymerasen schon lange bekannt ist (Johnston & McClure, 1976), auch mit der gereinigten Kalbsthymus RNA Polymerase II moeglich (diese Arbeit). Die Dinukleotidsynthese, die diese Art von "DNA-priming" ausschliesst, stimmt damit mit einer Arbeit von Mishoe et al. (1984) ueberein, die eine spezifische Transkription mit gereinigter Kalbsthymus RNA Polymerase II ohne Zellextrakte beschreibt.

Die Synthese von Dinukleosidtetraphosphaten durch Kalbsthymus RNA Polymerase II erweist sich erstaunlicherweise als nicht α -Amanitin sensitiv, obwohl die Synthese langkettiger RNA durch das Toxin unterdrueckt wird. Zu einer aehnlichen Aussage kommen Vaisius und Wieland (1982), die die Synthese von ApU mit Adenosin als Primer an poly(dA-dT) untersucht haben. Die Knuepfung der je ersten Phosphodiesterbindung, also auch die Verlaengerung eines Dinukleotidprimers zum Trinukleotid, wird nicht durch α -Amanitin gehemmt, da ihrer Meinung nach α -Amanitin nur den Translokationsmechanismus der Kalbsthymus RNA Polymerase II hemmt. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu dem der RNA Polymerase II aus Weizenkeim, bei welcher sowohl die RNA- als auch die Dinukleosidtetraphosphatsynthese von α -Amanitin gehemmt wird (Mosig et al., 1985).

Da die Dinukleotidsynthese durch die verwendete Kalbsthymus RNA Polymerase II Anreicherung jedoch DNA abhaengig und durch Heparin hemmbar ist (Fig.5.), kann man davon ausgehen, dass die Reaktion nicht auf eine Verunreinigung in der Praeparation zurueckzufuehren ist, sondern auf das gleiche Enzym, welches die langkettige RNA α -Amanitin sensitiv synthetisiert.

Ein weiterer Hinweis auf Kalbsthymus RNA Polymerase II als das fuer die Dinukleotidsynthese verantwortliche Enzym ergibt sich, wenn man die Peakfraktionen der Kalbsthymus RNA Polymerase II Anreicherung parallel einem Dinukleotid- und einem RNA Test unterwirft. Der Quotient von Dinukleotid- zu RNA Synthese erweist sich ueber alle Fraktionen als fast konstant (Fig.7.B.).

Ein Charakteristikum fuer die RNA Polymerase II ist der Energiebedarf bei spezifischer Initiation, der durch die Hydrolyse einer β - γ ATP Bindung gedeckt wird (Sawadogo et al., 1984). Moeglicherweise ist dies der Grund dafuer, dass bei Dinukleotidsynthese-Ansaetzen, die nur UTP, CTP oder Ado/UTP enthalten, fast kein Produkt entsteht (Fig.5.A.,B., Fig.15. und Fig.16.). Allerdings bildet sich bei einem Austausch von ATP gegen AMP, ADP oder GTP eine deutliche Menge Dinukleotid. Nach Sawadogo et al.(1984) genuegen zwar relativ geringe Konzentrationen von ATP - der K_M Wert liegt bei 20 μM , d.h. etwa 4% der im Standardansatz verwendeten Nukleotidkonzentration - aber es ist fraglich, ob die Verunreinigungen der kaeuflichen Nukleosidverbindungen, die unter 1 % liegen, fuer diese Dinukleotidsynthese verantwortlich sind.

Eine andere Erklaerung fuer die geringe Dinukleotidbildungsrate bei Ansaetzen ohne ATP ergibt sich aus der Praeferenz der RNA Polymerase II fuer Purinderivate,

besonders ATP, als Startnukleotide (Sassone-Corsi et al., 1981).

Auch Hefe RNA Polymerase II zeigt nur mit Purinen als Primer eine Dinukleotidsynthese-Aktivitaet, wobei die Bildung von pApU gegenueber der von pGpU deutlich bevorzugt ist (Lescure et al., 1981).

Die in der Kalbsthymus RNA Polymerase II Praeparation enthaltene basenunspezifische Nukleosidtriphosphat-Phosphohydrolase, die sich als weder DNA abhaengig, noch Heparin oder α -Amanitin hemmbar erweist (Fig.5.), ist schon von Vaisius und Wieland (1982) beschrieben worden. Diese Phosphohydrolase ist eine bekannte "Verunreinigung" von *Escherichia coli* RNA Polymerase, die hier den Zweck hat Transkriptionsfehler zu vermeiden. Volloch et al.(1979) wiesen nach, dass die Nukleosidtriphosphat-Phosphohydrolase nicht komplementaere Nukleosidtriphosphate zu Diphosphaten hydrolisiert, die fuer einen Elongationsschritt von der RNA Polymerase nicht als Substrat akzeptiert werden. Auch ohne Matriz e hydrolysiert dieses Enzym allerdings eine deutliche Menge der Nukleosidtriphosphate (Ninio et al., 1975).

Die Steigerung der Dinukleotidsynthese durch den Ersatz von Mg^{2+} durch Mn^{2+} um das 5-6 fache (Tab.4.) erweist sich als geringer als die der Weizenkeim RNA Polymerase II, die an der gleichen Matriz e (pSmaF/SmaI) etwa um das 10-12 fache stimuliert wird (Mosig et al., 1985), am Nopalinsynthese Fragment aus *Agrobacterium tumefaciens* sogar um das 50-100 fache (Schaeffner, 1984). Diese DNA Abhaengigkeit der Mn^{2+} Stimulierung ist moeglicherweise z.T. auf die Bindung von Mn^{2+} an das N-7 Atom des Guanins zurueckzufuehren und folglich an den GMP Gehalt einer DNA gekoppelt (Luck et al., 1972).

Die Abhaengigkeit der Synthese bestimmter Dinukleosid-tetraphosphate von der Nukleosidtriphosphatkonzentration zeigt, dass die RNA Polymerase verschiedene Startstellen auf einer DNA Matrize benutzt. Liegen die verwendeten Nukleotide in gleicher Konzentration vor, so ergibt sich auch ein Hinweis auf die Affinitaet der Initiationskomplexe fuer einzelne Nukleotidkombinationen.

An dem Plasmid pSmaF/SmaI nimmt in diesem Sinn die Affinitaet fuer die Nukleotidkombinationen ATP/UTP > ATP/ATP > ATP/CTP in der genannten Reihenfolge ab.

Eine bekannte Eigenschaft von Mn^{2+} ist die Hemmung des "DNA priming" bei der Transkription (Lewis & Burgess, 1982). Andererseits beschreiben die gleichen Autoren, dass Mn^{2+} - bei Weizenkeim RNA Polymerase II - die "nick" induzierte *de novo* Synthese von RNA foerdert. Die auf diese Weise initiierte RNA startet dann meistens mit GTP. Poly(ADP-Ribose)Polymerase ist ein eukaryontischer Transkriptionsfaktor fuer RNA Polymerase II, der durch Anlagerung an DNA "nicks" eine Initiation an solchen Stellen verhindert (Slattery et al., 1983). Eine in Gegenwart dieses Enzyms durchgefuehrte abortive Initiation mit Hilfe von Mn^{2+} erbringt jedoch nicht die erwartete Reduktion der Synthese von pppGpG/ppp(A,G), sondern die von ppp(A,U), unabhaengig von der verwendeten DNA bzw. den verwendeten Restriktionsenzymen (Fig.18.), die u.U. speziesspezifische "nicks" erzeugen koennen (Lewis & Burgess, 1980). Moeglicherweise hat daher Poly(ADP-Ribose)Polymerase noch weitere Funktionen bei der eukaryontischen Transkription.

Der Ersatz von Mg^{2+} durch Mn^{2+} hat qualitativ keinen Einfluss auf die Praeferenz der RNA Polymerase fuer bestimmte DNA Matrizen und auch der Zustand der DNA - "relaxed" oder "supercoiled" - bewirkt keine Verschiebung der Spezifitaet des Enzyms (Tab.7.). Dieser Versuch zeigt , dass Kalbsthymus RNA Polymerase II nicht vorwiegend an "nicks" oder 3'-OH Enden einer DNA initiiert, da sich in der Transkriptionseffizienz der ungeschnittenen bezogen auf die - mit verschiedenen Restriktionsenzymem - geschnittenen Plasmide kein Unterschied ergibt.

Die an allen getesteten Matrizen gefundene Synthese der Dinukleotide ppp(A,U) und pppApA spricht fuer die Beobachtung, dass eukaryontische RNA Polymerase II Initiationskomplexe an der Goldberg-Hogness Box einer DNA ausbildet (Davison et al., 1983; Parker & Topol, 1984). Kalbsthymus RNA Polymerase II initiiert nach Mishoe et al. (1984) auch ohne Zellextrakte im Bereich der TATA Box von Ad 2 DNA.

Da das Enzym - in Abhaengigkeit von der eingesetzten DNA Matrize - aber auch weitere Dinukleosidtetraphosphate synthetisiert, sind die Sequenzen von drei DNA Matrizen im Bereich der Goldberg-Hogness Box zusammengestellt (Tab.11.). Daraus sollte eine moegliche Koinzidenz der Initiationsstellen dieser Dinukleotide mit dem Bereich der TATA Box ersichtlich werden.

Tab.11. Sequenzen um die Initiationsstellen der RNA Synthese fuer verschiedene Matrizen.

DNA	Goldberg-Hogness Box	Initiationsstelle

		+1
β -Globin	AGGCGATAAAAGTGG	CTC <u>ACC</u> AGCGT
SmaF	GGGCTATAAAAGGGG	GTCCTC <u>ACT</u> CT
Lys	GGAAGTTAAAAGAAG	GCTTGC <u>AGT</u> CC

Die in vivo Initiationsstellen fuer die RNA Synthese sind unterstrichen, die Hauptinitiationsstelle ist unter "+1" eingeordnet. Die Position "-30" ist durch Fettdruck gekennzeichnet.

Die Sequenzen sind den folgenden Literaturstellen entnommen :

Dolan et al., 1983	(β -Globin)
Gingeras et al., 1982	(SmaF)
Grez et al., 1981	(Lys)

Danach koennen an β -Globin, SmaF und Lys die Dinukleotide ppp(A,U) und ppp(A,G) im Bereich der TATA Box (Mishoe et al., 1984: -25 bis -30) synthetisiert werden.

An p0,8 wird - im Gegensatz zu allen anderen getesteten Matrizen - mehr pppGpG/ppp(A,G) als ppp(A,U) synthetisiert. Eine moegliche Deutung dieser Beobachtung ergibt sich, wenn man annimmt, dass die Dinukleotidsynthese in der gleichen Richtung wie die mRNA Synthese stattfindet (angeschriebene Sequenz in Tab.11.). Danach kann im Bereich der TATA Box kein pppApU, sondern nur pppUpA entstehen.

Da das an allen getesteten Matrizen (Ausnahme pSSS) gebildete pppGpG, welches die gleichen gelelektrophoretischen Eigenschaften wie ppp(A,G) aufweist, nicht innerhalb der Goldberg-Hogness Box initiiert werden kann, scheint die Kalbsthymus RNA Polymerase II nicht nur in diesem Bereich zu starten.

Eine vermehrte Dinukleotidsynthese mit einer Sequenz, die der des mRNA Starts entspricht, laesst sich nicht nachweisen; nur an SmaF wird das Dinukleotid ppp(A,C) im Verhaeltnis zu ppp(A,U) in deutlichem Ausmass synthetisiert.

Gegen die Hypothese einer Initiation im Bereich der TATA Box spricht die Tatsache, dass das in einer abortiven Initiation am Nopalinsynthasegen aus *Agrobacterium tumefaciens* von Weizenkeim RNA Polymerase II synthetisierte ppp(A,U) bzw. pppApA, nicht vermehrt an dem DNA Fragment entsteht, welches die TATA Box enthaelt (Schaeffner, 1984).

Obwohl die Kalbsthymus RNA Polymerase II eine DNA abhaengige Praeferenz fuer bestimmte Nukleotidkombinationen zeigt, koennen die gebildeten Dinukleotide aber auch durch ein "Oszillieren" des Enzyms um beliebige (spezifische) Initiationsstellen entstehen (Samuels et al., 1984). Um diese zu lokalisieren sind weitere Experimente notwendig.

Bei der abortiven Initiation an chimaeren Plasmiden synthetisiert die Kalbsthymus RNA Polymerase II nicht nur Dinukleotide am eukaryontischen Fragment, sondern auch am prokaryontischen Vektorteil. Unter den Bedingungen einer spezifischen Transkription wird keine RNA an prokaryontischen Sequenzen gebildet, obwohl unter bestimmten Umstaenden - wie einem Defekt der TATA Box - Initiationskomplexe an TATA Box-aehnlichen Sequenzen des Vektors (pBR322) nachweisbar sind (Davison et al., 1983). Moeglicherweise fuehren solche, fuer die RNA Synthese inaktive Komplexe, unter den Bedingungen der abortiven Initiation zur Dinukleotidsynthese.

Allerdings wird an den eukaryontischen Fragmenten von pSmaF, p β EH2,0 oder pSSS, bezogen auf eine bestimmte DNA Laenge, ungefaehr doppelt so viel Dinukleotid synthetisiert wie am prokaryontischen Vektorfragment. Hefe RNA Polymerase II synthetisiert, im Vergleich dazu, an einem chimaeren Plasmid, welches Hefe DNA enthaelt, das Dinukleotid pApU etwa vier mal besser als am prokaryontischen Vektor (pBR322) allein (Lescure et al., 1981). Die Dinukleotidmengen, die an den isolierten Fragmenten von pSmaF entstehen, addieren sich zu der Menge, die an dem geschnittenen Plasmid gebildet wird (Tab.8.). Diese Additivitaet laesst sich gut erklaren, wenn man annimmt, dass trotz des - im Fall der isolierten Fragmente - gestiegenen Verhaeltnisses von RNA Polymerase zu DNA Menge (es werden jeweils equimolare DNA Mengen eingesetzt), immer die gleichen, oder zumindest die gleiche Anzahl, von Initiationsstellen benutzt wird.

Die Dinukleotidsynthese am Vektorfragment kann bei einem Vergleich verschiedener Plasmide mit gleichen oder aehnlichen Vektoren ausser Betracht bleiben, muss aber z.B. bei einer Analyse der Startstellen an einer DNA Matriz e beruecksichtigt werden.

Die eukaryontische Transkription verläuft, möglicherweise mit Hilfe gewisser DNA bindender Proteine, speziesspezifisch (Tsuda & Suzuki, 1981; Triadou et al., 1983; Dynan & Tjian, 1983b; Grummt, pers.Mitteilung). Aber auch die gereinigte Kalbsthymus RNA Polymerase II scheint bei der abortiven Initiation unter bestimmten Bedingungen zwischen verschiedenen DNA Spezies zu differenzieren. Während ein Vergleich der Dinukleotidsyntheseraten von pppGpG/ppp(A,G) an verschiedenen Matrizen keine derartige Differenzierung aufweist (Fig.21. und Fig.22.1,3), zeigt sich bei der Synthese von ppp(A,U) eine Präferenz der RNA Polymerase für die homologe Kalbsthymus DNA (Fig.14.). Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass die verwendete Kalbsthymus RNA Polymerase II Präparation noch einen "speziesspezifischen" Faktor enthält, denn diese Proteine sind teilweise nur schwer von der RNA Polymerase abzutrennen (Dynan & Tjian, 1983a; vgl. auch bei RNA Polymerase I, Grummt, pers.Mitteilung). Eine andere Möglichkeit ist, dass die DNA, auf Grund ihrer Sequenz oder Tertiärstruktur, diese Differenzierung bewirkt. Besondere DNA Strukturen, wie "hairpins" können als Initiationsstellen für gereinigte eukaryontische RNA Polymerase II dienen (Tsuda & Suzuki, 1982). Bemerkenswerterweise ist diese "speziesabhängige" Dinukleotidsynthese nur bei der Bildung von Dinukleotiden zu erkennen, die (u.a.) bei einer Initiation an der TATAA Box einer DNA entstehen können, also ppp(A,U) und pppApA.

Ein Vergleich der RNA Polymerasen II aus Kalbsthymus- und Weizenkeim zeigt, dass beide bevorzugt pppApA und ppp(A,U) synthetisieren (vgl. Schaeffner, 1984), das Kalbsthymus Enzym darüber hinaus aber auch andere Dinukleotide in hoher Ausbeute bildet. Bei der Synthese der Dinukleotide pppGpG/ppp(A,G), die von Kalbsthymus- und Weizenkeim RNA

Polymerase II an tierischer- bzw. pflanzlicher DNA synthetisiert werden, laesst mit dieser Nukleotidkombination nur das Weizenkeimenzym eine Praeferenz fuer die homologe DNA erkennen (Fig.22.).

Weizenkeim RNA Polymerase II scheint jedoch auch mit der Nukleotidkombination ATP/UTP zwischen verschiedenen Matrizen zu differenzieren, da eine abortive Initiation am SmaF Fragment (Ad 2 MLP) - im Gegensatz zu der mit Kalbsthymus RNA Polymerase II - kaum zur Synthese von ppp(A,U) fuehrt (Schaeffner, 1984). Dieses Verhalten steht in Einklang mit Ergebnissen aus der RNA Synthese, wonach Weizenkeim RNA Polymerase II an Ad 2 DNA inaktiv ist (Wasylik et al., 1980).

Literaturverzeichnis

- Brack, R. (1983) *In vitro* transcription of the *Escherichia coli* plasmid pBR322 with the RNA Polymerase from *Micrococcus luteus*, Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universitaet, Muenchen
- Bunick, D., Zandomeni, R., Ackerman, S. & Weinmann, R. (1982) Mechanism of RNA Polymerase II - Specific Initiation of Transcription *in Vitro*: ATP Requirement and Uncapped Runoff Transcripts. *Cell* 29, 877-886
- Carnevali, F., Caserta, M. & Pedone, E. (1983) Topological Modifications and Template Activation are Induced in Chimaeric Plasmids by Inserted Sequences. *J. Mol. Biol.* 165, 59-77
- Chamberlin, M. J. (1976) RNA Polymerase - An Overview, in *RNA Polymerase* (Losick, R. & Chamberlin, M. eds.) pp 17-67 Cold Spring Harbour, New York
- Cooke, R. M., Penon, P., Got, C. & Miassod, R. (1983) Selective transcription of a cloned cauliflower mosaic virus DNA fragment *in vitro* by soybean RNA polymerase II in the presence of dinucleotide primers. *Eur. J. Biochem.* 137, 365-371
- Coppola, J. A., Field, A. S. & Luse, D. S. (1983) Promoter-proximal pausing by RNA Polymerase II *in vitro*: Transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1251-1255
- Davison, B. L., Egly, J.-M., Mulvihill, E. R. & Chambon, P. (1983) Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences. *Nature* 301, 680-686
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. & Goodman, H. M. (1982) Nopalinsynthase: Transcript Mapping and DNA Sequence. *J. Molec. Appl. Genet.* 1, 561-573

- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. & Roeder, R.R. (1983a) Accurate transcription initiation by RNA Polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acid Research* 11, 1475-1489
- Dignam, J.D., Martin, P.L., Shastri, B.S. & Roeder, R.G. (1983b) Eucaryotic Gene Transcription with Purified Components in *Methods in Enzymology*, 101 (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. eds) pp 582-598, New York, Academic Press
- Dolan, M., Dodgson, J.B. & Engel, J.D. (1983) Analysis of the Adult Chicken β -Globin Gene. *J. Biol. Chem.* 258, 3983-3990
- Dreyer, C. & Hausen, P. (1976) On the Mechanism of Rifampicin Inhibition of RNA Synthesis. *J. Biol. Chem.* 253, 8949-8956
- Dynan, W.S. & Tjian, R. (1983a) Isolation of Transcription Factors That Discriminate between Different Promoters Recognized by RNA Polymerase II. *Cell* 32, 669-680
- Dynan, W.S. & Tjian, R. (1983b) The Promoter-Specific Transcription Factor Spl Binds to Upstream Sequences in the SV40 Early Promoter. *Cell* 35, 79-87
- Ernst, H., Filipowicz, W. & Shatkin, A.J. (1983) Initiation by RNA Polymerase II and Formation of Runoff Transcripts Containing Unblocked and Unmethylated 5' Termini. *Molecular and Cellular Biology* 3, 2172-2179
- Fernley, H.N. & Walker, P.G. (1967) Studies on Alkaline Phosphatase. *Biochem. J.* 104, 1011-1018
- Fire, A., Samuels, M. & Sharp, P.A. (1984) Interactions between RNA Polymerase II, Factors and Template Leading to Accurate Transcription. *J. Biol. Chem.* 259, 2509-2516
- Gingeras, T.R., Sciaky, D., Gelinas, R.A., Bing-Dong, J., Yen, C.E., Kelly, M.M., Bullock, P.A., Parsons, P.L., O'Neill, K.E. & Roberts, R.J. (1982) Nucleotide Sequences form the Adenovirus-2 Genome. *J. Biol. Chem.* 257, 13475-13491

- Greze, M., Land, H., Giesecke, K. & Schuetz, G. (1981) Multiple mRNAs Are Generated from the Chicken Lysozyme Gene. *Cell* 25, 743-752
- Hodo, H.G. & Blatt, S.P. (1977) Purification Using Polyethylenimine Precipitation and Low Molecular Weight Subunit Analysis of Calf Thymus and Wheat Germ DNA Dependent RNA Polymerase II. *Biochemistry* 16, 2334-2343
- Hurlbert, R.B. (1957) Preparation of Nucleoside Diphosphates and Triphosphates in *Methods of Enzymology* (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. eds) vol III, pp 785-805, Academic Press, New York - London
- Johnston, D.E. & McClure, W.R. (1976) Abortive Initiation of *In Vitro* RNA Synthesis on Bacteriophage λ DNA in RNA Polymerase. (Losick, R. & Chamberlin, M. eds) pp413-428
- Jove, R. & Manley, J.L. (1984) *In Vitro* Transcription from Adenovirus 2 Major Late Promoter Utilising Templates Truncated at Promoter-proximal Sites. *J. Biol. Chem.* 259, 8513-8521
- Kadesch, T.R. & Chamberlin, M.J. (1982) Studies of *in Vitro* Transcription by Calf Thymus RNA Polymerase II Using a Novel Dublex DNA Template. *J. Biol. Chem.* 257, 5286-5295
- Kedinger, C. & Chambon, P. (1972) Animal DNA-Dependent RNA Polymerases. *Eur. J. Biochem.* 28, 283-290
- Lavialle, C., Sekura, R., Madden, M.-J. & Salzman, N.P. (1982) Interaction between Calf Thymus RNA Polymerase II and Singly Nicked Simian Virus 40 DNA. *J. Biol. Chem.* 257, 12458-12466
- Lescure, B., Williamson, V. & Sentenac, A. (1981) Efficient and selective initiation by yeast RNA polymerase B in a dinucleotide-primed reaction. *Nucleic Acid Research* 9, 31-45
- Lescure, B. (1983) Pure Yeast RNA Polymerase B (II) Initiates Transcription at Specific Points on Supercoiled Yeast DNA. *J. Biol. Chem.* 258, 946-952

- Lewis, M.K. & Burgess, R.R. (1980) Transcription of Simian Virus 40 DNA by Wheat Germ RNA Polymerase II. *J. Biol. Chem* 255, 4928-4936
- Lewis, K.M. & Burgess, R.R. (1982) Eucaryotic RNA Polymerases in *The Enzymes*, 3rd ed., vol 15B (Boyer, P.D. ed.) pp 109-153
- Luck, G. & Zimmer, C. (1972) Conformational Aspects and Reactivity of DNA. *Eur. J. Biochem.* 29, 528-536
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory, New York
- Manley, J.L., Fire, A., Cano, A., Sharp, P.A. & Gefter, M.L. (1980) DNA-dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole cell extract. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3855-3859
- Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1977) A New Method for Sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 560-595
- McClure, W.R. & Cech, C.L. (1978) On the Mechanism of Rifampicin Inhibition of RNA Synthesis. *J. Biol. Chem.* 253, 8949-8956
- Mishoe, H., Brady, J.N., Lancz, G. & Salzman, N.P. (1982) *In Vitro* Transcription Initiation by Purified RNA Polymerase II within the Adenovirus 2 Major Late Promoter Region. *J. Biol. Chem.* 259, 2236-2242
- Mosig, H. (1982) Die Wirkung von Nukleosiden und deren Analoga auf die Initiation der RNA Polymerase Reaktion. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilian Universitaet Muenchen
- Mosig, H., Schaeffner, A., Sieber, H. & Hartmann, G.R. (1985) Primer-independent abortive initiation by wheat-germ RNA Polymerase B (II). *Eur. J. Biochem.* 149, 337-343
- Ninio, J., Bernardi, F., Brun, G., Assairi, L., Lauber, M. & Chapeville, F. (1975) On The Mechanism Of Nucleotide Incorporation Into DNA And RNA. *FEBS Letters* 57, 139-144

- Parker, C.S. & Topol, J. (1984) A *Drosophila* RNA Polymerase II Transcription Factor Contains a Promoter-Region-Specific DNA-Binding Activity. *Cell* 36, 357-369
- Pedone, F. & Ballario, P. (1984) Stimulation of Yeast RNA Polymerase II Transcription by Critical Values of Supercoiling. *Biochemistry* 23, 69-73
- Randerath, K. & Randerath, E. (1967) Thin-Layer Separation Methods for Nucleic Acid Derivatives in *Methods of Enzymology* (Grossman, L. & Moldave, L.K. eds) vol 12, pp 323-347, Academic Press, New York - London
- Reddy, V.B., Thimmappaya, B., Dhar, R., Subramanian, K.N., Zain, B.S., Pan, J., Ghosh, P.K., Celma, N.L. & Weisman, S.M. (1978) The Genome of Simian Virus 40. *Science* 200, 494-502
- Samuels, M., Fire, A. & Sharp, P.A. (1982) Separation and Characterisation of Factors Mediating Accurate Transcription by RNA Polymerase II. *J. Biol. Chem* 257, 14419-14427
- Samuels, M., Fire, A. & Sharp, P.A. (1984) Dinucleotide Priming of Transcription Mediated by RNA Polymerase II. *J. Biol. Chem.* 259, 2517-2525
- Sassone-Corsi, P., Corden, J., Kedinger, C. & Chambon, P. (1981) Promotion of specific *in vitro* transcription by excised "TATA" box sequences inserted in a foreign nucleotide environment. *Nucleic Acid Research* 9, 3941-3958
- Sawadogo, M. & Roeder, R.G. (1984) Energy Requirement for Specific Transcription Initiation by the human RNA Polymerase II System. *J. Biol. Chem.* 259, 5321-5326
- Schaeffner, A. (1984) Spezifitaeten der Weizenkeim RNA Polymerase II bei der abortiven Initiatiin am Nopalinsynthase-Gen. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians Universitaet, Muenchen.
- Schweitzer, S., Blohm, D. & Geider, K. (1980) Expression of Ti-Plasmid DNA in *E.coli* : Comparison of Homologous Fragments Cloned from Ti Plasmids of Agrobakterium Strains C58 and Ach5. *Plasmid* 4, 196-204

- Slattery, E., Dignam, J.D., Matsui, T. & Roeder, R.G. (1983) Purification and Analysis of a Factor Which Suppresses Nick-induced Transcription by RNA Polymerase II and Its Identity with Poly(ADP-ribose)Polymerase. *J. Biol. Chem.* 258, 5955-5959
- Sutcliffe, J.G. (1978) pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. *Nucleic Acid Research* 5, 2721-2728
- Triadou, P., Lelong, J.-C., Gros, F. & Crepin, M. (1983) Tissue-specific formation of transcription-initiation complexes at the 5' end of the mouse β -major globin gene. *Eur. J. Biochem.* 135, 163-168
- Tsuda, N. & Suzuki, Y. (1981) Faithful Transcription Initiation of Fibroin Gene in a Homologous Cell-Free System Reveals an Enhancing Effect of 5' Flanking Sequence Far Upstream. *Cell* 27, 175-183
- Tsuda, N. & Suzuki, Y. (1982) Efficient and Strand-selective *in Vitro* Transcription Initiation by Purified RNA Polymerase II from a Unique Site of the Fibroin Gene. *J. Biol. Chem.* 257, 12367-12372
- Vaisius, A.C. & Wieland, T. (1982) Formation of a Single Phosphodiester Bond by RNA Polymerase B from Calf Thymus Is Not Inhibited by α -Amanitin. *Biochemistry* 21, 3097-3101
- Volloch, V.Z., Rits, S. & Tamerman, T. (1979) A possible mechanism responsible for the correction of transcription errors. *Nucleic Acid Research* 6, 1535-1546
- Wasylik, B., Kedinger, C., Corden, J., Brison, O. & Chambon, P. (1980) Specific *in vitro* initiation of transcription on conalbumin and ovalbumin genes and comparison with adenovirus-2 early and late genes. *Nature* 285, 367-372
- Weil, P.A., Luse, D.S., Segall, J. & Roeder, R.G. (1979) Selective and Accurate Initiation of Transcription at the Ad 2 Major Late Promoter in a Soluble System Dependent on Purified RNA Polymerase II and DNA. *Cell* 18, 469-484

Yang, R.C.-A., Lis, J. & Wu, R. (1979) Elution of DNA from
Agarose Gels after Electrophoresis. *Methods in Enzymology*
68, 176-182

Abkuerzungsverzeichnis

pSmaF	pBR313 mit dem SmaF Fragment aus Ad2
p0,8	pBR322 mit dem Lysozym Gen aus Huhn
p β -EH2,0	pBR322 mit dem β -Globin Gen aus Huhn
pSV	pBR322 mit der SV40 Virus DNA
pSSS	pBR322 mit dem Sucrosesynthetase Gen aus Mais
pSS83	pDB800 (pBR325 Derivat) mit dem Nopalin Synthase Gen aus dem Ti Plasmid des <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
pSmaF/SmaI	mit SmaI geschnittenes Plasmid pSmaF
Ad 2 MLP	Adenovirus 2 Major Late Promotor
KT	Kalbsthymus
KT-P	Kalbsthymus RNA Polymerase II
WK-P	Weizenkeim RNA Polymerase II
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
TBE Puffer	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE Puffer	Tris-EDTA Puffer
DTT	Dithiothreitol
MOPS	3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid
DN	Dinukleotid
PEI Cellulose	Polyethylenimin Cellulose
Bp	Basenpaar
cpm	counts per minute

Lebenslauf

Name	Angelika Zufall
Geburtsdatum	29.10.56
Geburtsort	Hannover
Familienstand	ledig
Staatsangehoerigkeit	deutsch
Eltern	Walter Zufall, Diplomingenieur Anneliese Zufall
Schulausbildung	
1963 - 66	Grundschule Wenden bei Braunschweig
1966 - 67	Gymnasium in Braunschweig
1968 - 69	Gymnasium der deutschen Schule in Bruessel/Belgien
1970 - 75	St. Anna Gymnasium in Muenchen
21.6.75	Abitur (mathematisch- naturwissenschaftlicher Zweig)
Studium	
1975 - 1981	Chemie Studium an der Ludwig- Maximilians-Universitaet Muenchen
9.80 - 6.81	Diplomarbeit am Institut fuer Pharmakologie der LMU Muenchen bei Prof. Dr. G. Hartmann
15.6.81	Diplom
9.81 - 5.85	Doktorarbeit am Institut fuer Biochemie der LMU Muenchen bei Prof. Dr. G. Hartmann
31.5.85	Promotion

